

Dissertation

**Entwicklung molekularer Werkzeuge zur  
Erforschung des Lipidstoffwechsels**

—

**Synthese einer FRET-Sonde der  
sauren Sphingomyelinase**

Zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

**Dipl.-Chem. Thomas Pinkert**

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter:

1. Prof. Dr. Christoph Arenz
2. Prof. Dr. Rainer Mahrwald

Tag der mündlichen Prüfung:

20. Juni 2017



Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2011 bis März 2017 unter der Betreuung von Prof. Dr. C. Arenz am Lehrstuhl für Organische und Bioorganische Chemie des Instituts für Chemie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.





*meiner Familie*



*„Somit hoffe ich auch zur Beförderung  
der menschlichen Einsicht im Grossen  
einen kleinen Beitrag geliefert zu haben.“<sup>[1]</sup>*

J. L. W. THUDICHUM



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>V</b>
<b>Kurzfassung.....</b>	<b>VII</b>
<b>1   Einleitung &amp; Kenntnisstand.....</b>	<b>1</b>
1-1   Sphingomyelinasen .....	3
1-1-1   Sphingomyelin – Struktur & Funktion .....	3
1-1-2   Sphingomyelinasen – Funktion & Vorkommen.....	4
1-1-3   Saure Sphingomyelinase .....	5
1-1-4   Etablierte Sphingomyelinase-Assays .....	10
1-2   Biosynthese von Sphingosin.....	15
1-3   Chemische Synthese von Sphingosin .....	17
1-4   Phosphor-haltige Biomoleküle – Bedeutung & Synthese.....	19
1-5   Fluoreszenz – Prinzip & Anwendung .....	25
1-5-1   Allgemein.....	25
1-5-2   Umgebungseinfluss .....	27
1-5-3   Photoreaktionen.....	30
1-5-4   Ausgewählte Fluorophore .....	30
1-5-5   Fluoreszenzsonden.....	35
1-5-6   FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET).....	37
1-5-7   Multiphotonenmikroskopie (MPM) .....	43
<b>2   Zielstellung.....</b>	<b>45</b>
<b>3   Ergebnisse &amp; Diskussion .....</b>	<b>47</b>
3-1   Synthese der ASM-Sonden.....	47
3-1-1   Synthese der Cholin-ähnlichen Kopfgruppe .....	50
3-1-2   Fluoreszierende Fettsäure-Derivate.....	53
3-1-3   Stereoselektive Synthese von Sphingosin .....	55
3-1-4   Knüpfung des Phosphodiesters .....	59
3-1-5   Installation der Fluorophore .....	61
3-2   Synthese von Referenzsubstanzen.....	63
3-3   Absorptionsspektroskopie .....	65
3-4   Fluoreszenzspektroskopie .....	67
3-4-1   ASM-Sonde der ersten Generation .....	68
3-4-2   Konzept der phasentrennungsgestützten Signalverstärkung (PS).....	71
3-4-3   ASM-Sonde der zweiten Generation .....	77
3-4-4   Entwicklung eines homogenen ASM-Assays .....	82
3-4-5   FRET-Effizienz.....	89
3-5   Zweiphotonenanregungsfluoreszenzmikroskopie .....	92
3-5-1   2PE-Fluoreszenzmikroskopie auf <i>lipid beads</i> .....	92

3-5-2	2PE-Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Fibroblastenkulturen.	93
3-6	Kritische Diskussion .....	103
3-6-1	Struktur und Ladung.....	103
3-6-2	Mizellarer Assay .....	105
3-6-3	Charakterisierung des FRET-Paares.....	106
3-6-4	Mikroskopie.....	107
<b>4  </b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>109</b>
<b>5  </b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>113</b>
<b>6  </b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>117</b>
6-1	Reagenzien & Lösungsmittel .....	117
6-2	Puffer & Medien.....	117
6-3	Zellkultur & Präparate .....	118
6-3-1	Zellkultur .....	118
6-3-2	Transiente Lipofektion.....	118
6-3-3	Zelllyse.....	119
6-3-4	ASM-Präparation .....	119
6-3-5	Liposomenpräparation .....	119
6-3-6	Präparation von <i>lipid beads</i> .....	120
6-3-7	BSA-Komplexierung.....	120
6-4	Chromatographie .....	120
6-4-1	Analytische Dünnschichtchromatographie.....	120
6-4-2	Präparative Dünnschichtchromatographie .....	121
6-4-3	Präparative Säulenchromatographie .....	121
6-4-4	Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) .....	121
6-5	Spektroskopie.....	121
6-5-1	Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR) .....	121
6-5-2	Hochaufgelöste Massenspektrometrie (HRMS) .....	122
6-5-3	Röntgenkristallstrukturanalyse .....	122
6-5-4	Polarimetrie .....	122
6-5-5	Absorptionsspektroskopie .....	123
6-5-6	Fluoreszenzspektroskopie.....	123
6-6	Assay-Protokolle .....	123
6-6-1	Homogener <i>in vitro</i> ASM-Assay .....	123
6-6-2	Lipidextraktion & -analyse .....	124
6-6-3	Lipidanalyse mittels HPLC-FLD .....	125
6-7	Fluoreszenzmikroskopie.....	126
6-8	Synthese.....	127
6-8-1	Aminoethanol-Derivate .....	127
6-8-2	Fettsäure-Derivate.....	134
6-8-3	Sphingosine .....	141
6-8-4	Phosphatide.....	148
6-8-5	Sphingosylphosphate.....	149
6-8-6	Ceramide.....	159

<b>7   Literatur .....</b>	<b>165</b>
<b>8   Abkürzungen.....</b>	<b>173</b>
<b>9   Anhang .....</b>	<b>175</b>
9-1   Chromatogramme.....	175
9-2   Absorptionsspektren.....	179
9-3   Fluoreszenzspektren .....	182
9-4   Mikroskopieaufnahmen .....	184
9-5   Kristallographische Daten & Messparameter .....	185
9-6   NMR-Spektren.....	186
<b>Publikationen, Konferenzteilnahmen &amp; Auszeichnungen.....</b>	<b>227</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>229</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>231</b>





## Abstract

Fluorescent sphingomyelin analogues have been synthesized to probe the acid sphingomyelinase (ASM). Starting from L-serine, a sphingosine with natural stereochemistry was synthesized. Subsequently, phosphorodichloridate chemistry was used to install an aminoethyl phosphate moiety. Dual fluorescent labeling afforded probes capable of FÖRSTER resonance energy transfer (FRET). They were recognized as substrates of ASM and allowed for monitoring of the enzyme's activity *in vitro*. Through analysis of the fluorophores' photophysical properties, the general concept of partition-aided amplification of a FRET probe's signal (PS) was developed. This concept was successfully confirmed by the synthesis of a second-generation probe with 30-fold improved response. A homogenous assay was developed, which allowed for a quantitation of ASM activity. Using either purified recombinant human ASM, or lysates of HeLa cells or mouse embryonic fibroblasts (MEFs) as an enzyme source, complete and specific cleavage was observed exclusively under conditions preferred by ASM. Furthermore, the probe enabled the detection of relative levels of ASM activity in cultivated MEFs using fluorescence microscopy with two-photon excitation (2PE).

---

### Keywords:

Enzymes, Acid Sphingomyelinase, Phospholipids, Sphingolipids, Sphingomyelin, Ceramide, Fluorescence, Förster-Resonance Energy Transfer (FRET), Fluorescence-based Assays, Mouse Embryonic Fibroblasts (MEF), Two-photon Fluorescence Microscopy



## Kurzfassung

Die saure Sphingomyelinase (ASM) ist eine von mehreren Lipasen, die die Hydrolyse des Phospholipids Sphingomyelin zu Phosphorylcholin und Ceramid katalysieren. Letzteres ist im Rahmen des sogenannten *lipid signaling* ein potenter Mittler antiproliferativer Prozesse, dessen Konzentration unmittelbar von der ASM-Aktivität abhängt. Trotz jahrzehntelanger Forschung ist das Wirkmodell der ASM unvollständig, denn es mangelt an biochemischen Werkzeugen zum Studium des Enzyms. Zum einen erschwerte das Fehlen eines einfachen Assays bislang die Suche nach pharmakologischen Inhibitoren der ASM. Zum anderen zeigt isolierte ASM *in vitro* teils eine andere Aktivität als *in vivo*, was mikroskopische Studien an lebenden Zellen erforderlich macht. Im Rahmen dieser Arbeit galt es folglich, neue Moleküle und Methoden zu entwickeln, die das komplexe Umfeld der Reaktion naturgetreu nachbilden und zerstörungsfrei abbilden. Dies gelang mit der Synthese und Charakterisierung einer FRET-Sonde der sauren Sphingomyelinase, die sich zur Messung der Aktivität des Enzyms in einem homogenen Assay eignet und eine Bildgebung an lebenden Zellen mittels Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie erlaubt.

Dazu wurden im Rahmen dieser Arbeit durch chemische Synthese die fluoreszierenden Sphingomyelin-Analoga **0-2**, sowie die von diesen abgeleiteten Fragmente **3-5** dargestellt (siehe Abb. 0-1). Ein Schwerpunkt lag auf der Synthese zweifach markierter Sonden **1** und **2**, die FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET) erlauben.

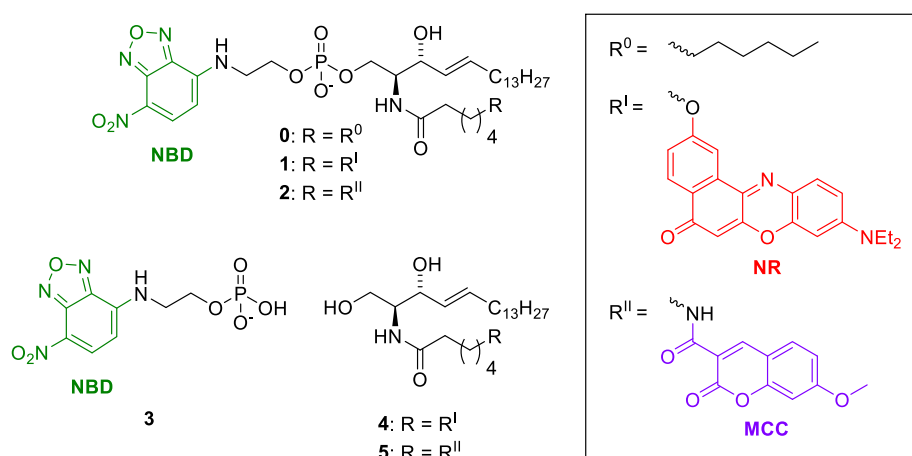


Abb. 0-1 | Im Rahmen dieser Arbeit dargestellte Verbindungen | oben: Sphingomyelin-Analoga **0-2**, unten: zugrundeliegendes NBD-Aminoethylphosphat **3**, sowie die korrespondierenden Ceramid-Analoga **4** und **5**. Die Verbindungen **1** und **2** zeigen durch duale Fluoreszenzmarkierung (NBD/NR bzw. NBD/MCC) FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET) und sind Substrate der sauren Sphingomyelinase (ASM).

Die gezeigten Verbindungen wurden mittels NMR- und UV/Vis-Spektroskopie sowie Massenspektrometrie charakterisiert und die Eignung der Verbindungen **0-2** als Substrat der ASM untersucht. In der Tat erlaubt ihre strukturelle Ähnlichkeit zum natürlichen Substrat Sphingomyelin eine Hydrolyse durch die ASM und damit die Echtzeitverfolgung der Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie. Dabei werden erwartungsgemäß das Fragment **3** und das jeweilige korrespondierende Ceramid gebildet. Im Verlauf der Arbeiten wurde das Konzept der Phasentrennungs-gestützten Signalverstärkung (PS) von FRET-Sonden entwickelt und mit der Synthese einer 30-mal leistungsfähigeren zweiten FRET-Sonde **2** praktisch umgesetzt.

Mithilfe der verbesserten Sonde **2** konnte ein homogener Assay etabliert werden, der eine relative Quantifizierung der ASM-Aktivität mittels Fluoreszenzspektroskopie erlaubt. Diese Methode erlaubt *in vitro* die Echtzeitverfolgung der Aktivität der ASM. Durch Tests unter Verwendung von Lysaten ASM-defizienter und wildtypischer muriner embryonaler Fibroblasten (MEFs) wurde eine große Selektivität der Sonde für ASM nachgewiesen. Ferner konnte die konzentrationsabhängige Inhibition der Reaktion durch einen Inosit-basierten Inhibitor gezeigt werden. Zudem konnte die FRET-Sonde **2** auch in lebenden Zellen erfolgreich eingesetzt werden. So konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie mit Zweiphotonenanregung (2PE) verfolgt werden, wie das intakte Molekül in kultivierte adhärente MEF-Zellen inkorporiert wird, wo es zum Ceramid **5** verstoffwechselt wird. Auch die erhöhte ASM-Aktivität ASM-überexprimierender MEFs konnte erfolgreich abgebildet werden. Entgegen der Ergebnisse *in vitro* zeigten jedoch auch ASM-defiziente MEFs einen Umsatz des Sondenmoleküls, dessen biologische Grundlage bislang ungeklärt ist. Diese Resultate unterstreichen die Wichtigkeit von Messungen in der lebenden Zelle, die mit dem hier vorgestellten biochemischen Werkzeug erstmals möglich sind.

Zukünftig könnten die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Moleküle und Methoden detaillierte Studien des Sphingolipidstoffwechsels im natürlichen Kontext erlauben. Zudem hat die hier vorgestellte fluorimetrische Messung der ASM-Aktivität das Potenzial zum Hochdurchsatz-*Screening* auf ASM-Inhibitoren.

---

**Schlagworte:**

Enzyme, Saure Sphingomyelinase, Phospholipide, Sphingolipide, Sphingomyelin, Ceramid, Fluoreszenz, Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), Fluoreszenz-basierte Assays, Murine Embryonale Fibroblasten (MEF), Zweiphotonenfluoreszenzmikroskopie

## 1 | Einleitung & Kenntnisstand

Aus der Perspektive des Chemikers erstaunt die Komplexität der Reaktionsabläufe in der lebenden Zelle. Mit kaum nachahmbarer Substratspezifität, Stereoselektivität und Energieeffizienz findet eine Vielzahl von Stoffwechselprozessen nebeneinander statt, ohne sich gegenseitig zu stören. In langen Kaskaden werden dabei Primär- und Sekundärmetabolite gebildet, deren theoretische Zahl größer ist, als die Anzahl der Atome im Universum.<sup>[2]</sup> Ein feines Netz von Regulationsmechanismen sorgt dafür, dass nichts unnötig verbraucht wird, Ausgangsstoffe stetig nachgeliefert und Nebenprodukte zügig wiederverwertet oder ausgeschieden werden. Die Grundlage dieser Fähigkeiten bilden im Laufe der Erdgeschichte evolvierte Biokatalysatoren, die Enzyme. Die Aufklärung ihrer Funktion, Struktur und Genese, ihrer komplexen Kreuzbeziehungen sowie der zugrundeliegenden Steuerungsmechanismen und der Auswirkungen etwaiger Fehlfunktionen ist ein Gegenstand der Biochemie und dauert bis zum heutigen Tage an.<sup>[3]</sup>

Ein leistungsfähiges Werkzeug zum Studium der Lebensprozesse ist die Mikroskopie, deren Entwicklung eng mit den Fortschritten zur Erforschung der Funktionsweise der Zelle verknüpft ist. Und doch verrät der bloße Blick durch das Mikroskop nur wenig von dieser beeindruckenden Maschinerie, die scheinbar unermüdlich den Stoffwechsel in Gang hält. Erst in Verbindung mit Methoden zur spezifischen Anfärbung der zellulären Strukturen und der zu untersuchenden Analyte erlaubt die Mikroskopie ein besseres Verständnis der molekularen Vorgänge. Ein strukturelles Detail, dass bei ausreichender Vergrößerung einer eukaryotischen Zelle auffällt, ist ihre Kompartimentierung, also die Abgrenzung verschiedener Reaktionsräume durch Lipidmembranen. Sie erlaubt es diesen Zellen, spezialisierte Zellorganellen mit ganz unterschiedlichen Milieus für ihre diversen Aufgaben bereitzustellen. Durch diese Unterteilung ist es möglich, dass ein und dasselbe Molekül durchaus verschiedene Funktionen ausübt, je nachdem an welchem Ort es sich befindet. Folglich erfordert das Studium eines Metaboliten nicht nur die Kenntnis seiner Chemie, sondern auch seines Ortes, woraus die Bedeutung der Mikroskopie und der Markierungstechniken letztlich resultiert. Eines der Kompartimente sind die Endosomen und Lysosomen tierischer Zellen. Gleich einem Kammerkomposter gewährleisten diese kugeligen Vesikel den graduellen enzymatischen Abbau von Biomasse und stellen das Material bereit, aus dem die Zelle neue Moleküle aufbauen kann. Gerät dieser Prozess ins Stocken, akkumuliert unverwertbares Material, was schwere Folgen für die Zelle hat.<sup>[4]</sup>

Eines der Enzyme dieses Systems ist die lysosomale saure Sphingomyelinase, die den Abbau des Membranbestandteils Sphingomyelin im Inneren des Lysosoms einleitet. Ihr Fehlen führt zu einer Anreicherung von Sphingomyelin und endet tödlich. Daneben wird das Enzym auch sekretiert und erfüllt auf der Zelloberfläche noch eine zweite wichtige Rolle. Dort erlaubt seine Aktivierung die rasche Bildung von Ceramid, welches als Mittler des induzierten Zelltodes fungiert. Beide – lysosomale und sekretierte saure Sphingomyelinase – katalysieren die gleiche Reaktion, ihr Effekt ist jedoch vollkommen verschieden. Folglich erfordert das Studium der sauren Sphingomyelinase eine räumliche Unterscheidung zwischen dem Lysosom und der Zelloberfläche, die aufgrund der gemeinsamen Genese der beiden Fraktionen problematisch ist. Hinzu kommt, dass die zu untersuchende Reaktion nicht frei in Lösung, sondern gewissermaßen an fester Phase auf der Oberfläche einer Membran stattfindet. Diese komplexe Umgebung im Reagenzglas nachzuvollziehen, stellt eine besondere Herausforderung dar. Moderne Techniken auf der Grundlage von Fluoreszenzerscheinungen eröffnen die Möglichkeit, Reaktionen auch in derartig komplexen Matrices zeitaufgelöst zu untersuchen.<sup>[5]</sup> Sie erlauben mitunter sogar eine zerstörungsfreie Beobachtung des Vorgangs in der lebenden Zelle. Im Lichte des einerseits vorhandenen Interesses am Wirken der sauren Sphingomyelinase und der andererseits dargelegten Schwierigkeiten dasselbe mit den vorhandenen Mitteln zu studieren, bedarf es der Entwicklung neuer biochemischer Werkzeuge, derer sich die vorliegende Arbeit widmet.

## 1-1 | Sphingomyelinasen

### 1-1-1 | Sphingomyelin – Struktur & Funktion

Sphingomyeline (SM) sind amphiphile Naturstoffe aus der Gruppe der Phospholipide. Sie wurden erstmals im Jahre 1884 vom Mediziner und Biochemiker J. L. W. THUDICUM beschrieben, der sie aus Gehirnlipiden isolieren konnte.<sup>[6]</sup> Wie in Abb. 1-1 gezeigt, handelt es sich dabei um Ceramide (Cer), deren 1-Hydroxylgruppe mit Phosphorylcholin verestert ist. Ceramide wiederum basieren auf dem chiralen, einfach ungesättigten Aminodialkohol Sphingosin ((2*S*,3*R*,4*E*)-2-Aminooctadec-4-en-1,3-diol), an dessen 2-Aminogruppe verschiedene Fettsäuren (hauptsächlich 16-24:0-1)<sup>a</sup> amidisch gebunden sind.<sup>[7]</sup> Je nach Art der Fettsäure kann sich die biologische Funktion unterscheiden.

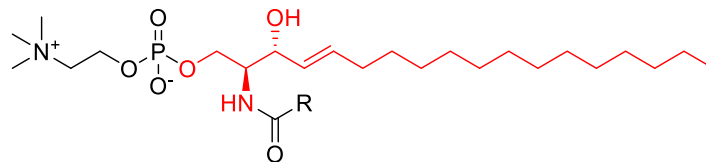


Abb. 1-1 | Struktur von Sphingomyelin & des zugrundeliegenden Sphingosins (rot) | R = var. Fettsäurerest.

In Eukaryoten sind Sphingolipide, darunter auch SM, eine der Hauptkomponenten der Plasmamembran, welche die Zelle nach außen abgrenzt. Je nach Zelltyp kann diese Membran bis zu 25% Sphingomyelin enthalten.<sup>[4]</sup> Dessen Kopfgruppe Phosphorylcholin ist zwar elektrisch neutral, aber dennoch hochpolar, ganz im Gegensatz zu den unpolaren Alkylresten. Deshalb bildet es, wie auch einige andere Lipide, in wässriger Lösung Doppelschichten (Membranen). Diese trennen zwei wässrige Reaktionsräume (Kompartimente) voneinander ab; eine Funktion, die von grundlegender Bedeutung für irdisches Leben ist. Die Fähigkeit einer Zelle, Membranen zu bilden, umzugestalten und abzubauen ist folglich eine Voraussetzung für ihren Fortbestand. Der Auf- und Abbau von Sphingomyelin ist im Kontext der Lipidhomöostase streng geregelt (siehe Abb. 1-2). Zum einen wird es durch Sphingomyelin-Synthasen (SMS) mittels Übertragung der Cholin-Kopfgruppe von Phosphatidylcholin auf Ceramid gebildet, zum anderen durch Sphingomyelinasen zu Ceramid und freiem Phosphorylcholin hydrolysiert. Auf diesem Wege wird gleichzeitig die lokale Konzentration von Cer reguliert, als dessen Reservoir SM betrachtet werden kann.

<sup>a</sup> Kurznamenklatur der Fettsäuren: (Anzahl der Kohlenstoffatome: Anzahl der Doppelbindungen)

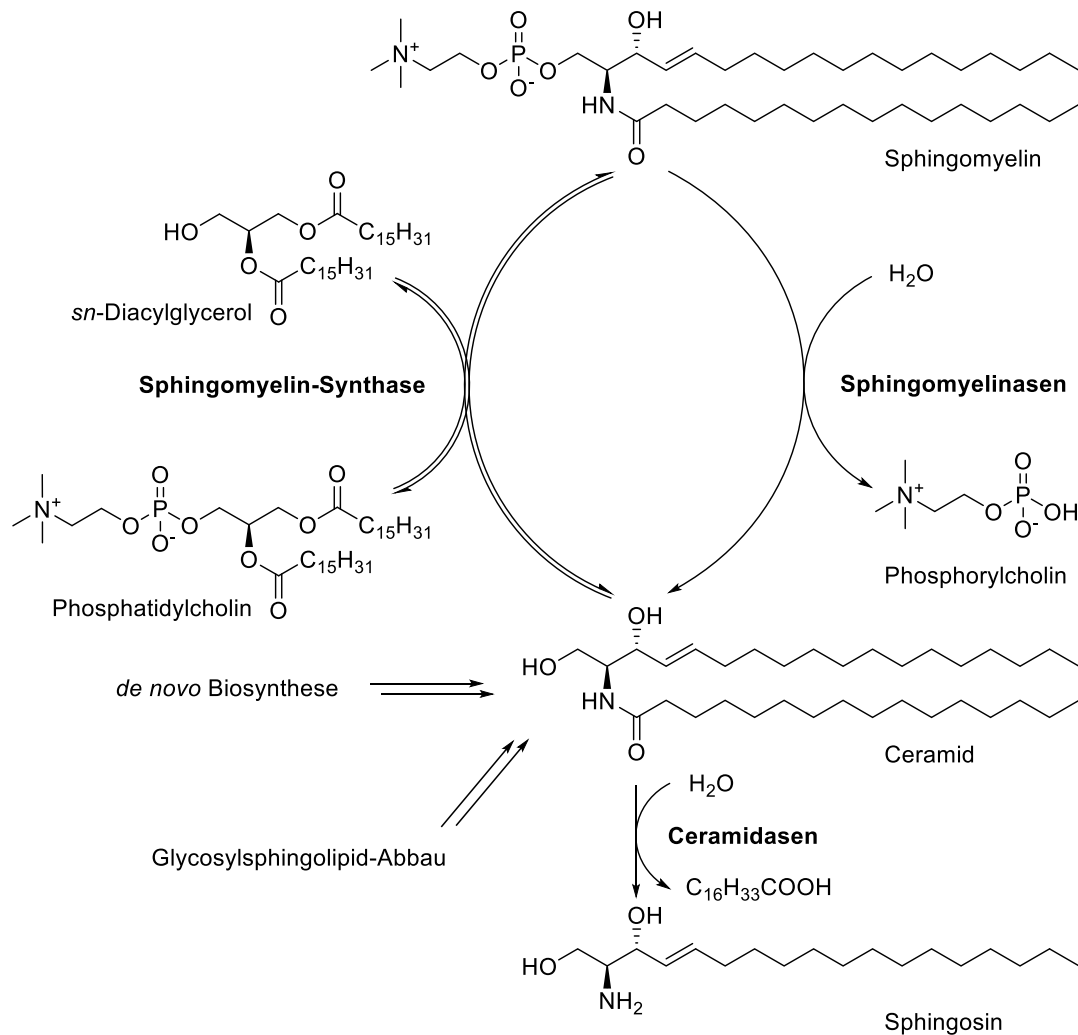


Abb. 1-2 | Ausschnitt aus dem Sphingolipid-Metabolismus | Ceramide sind die zentrale Drehscheibe über die sowohl der Aufbau, als auch der Abbau von Sphingomyelin und anderen Sphingolipiden verläuft. Anstelle von Palmitinsäure können in den hier gezeigten Lipiden weitere mittel- bis langkettige Fettsäuren mit variablem Sättigungsgrad vorkommen.<sup>[4,8]</sup>

Zwar besitzt SM hauptsächlich Baustofffunktion, jedoch hat es auch pathophysiologische Bedeutung. Zum einen führt die Akkumulation von Sphingomyelin durch einen Sphingomyelinasemangel zur Lipid-Speicherkrankheit Morbus NIEMANN-PICK Typ A & B,<sup>[9]</sup> zum anderen scheint es auch in neurologische Krankheitsgeschehen involviert zu sein. Kürzlich gelang der Arbeitsgruppe HoF der Nachweis,<sup>[10]</sup> dass die Bildung von  $\beta$ -Amyloid-Oligomeren, welche mit der ALZHEIMER-Krankheit in Verbindung gebracht werden, durch Sphingomyelin initiiert wird und durch physiologische Konzentrationen des Gangliosids GM<sub>1</sub> (ebenfalls ein Sphingolipid) inhibiert wird.

### 1-1-2 | Sphingomyelinasen – Funktion & Vorkommen

Sphingomyelinasen sind Enzyme aus der Gruppe der Phosphodiesterasen. Sie katalysieren die Hydrolyse des Membranbestandteils Sphingomyelin zu Ceramiden und



Phosphorylcholin (Abb. 1-2) zum Zwecke der Lipidhomöostase, Verdauung und Signaltransduktion. Während die beiden ersten Funktionen, die vor allem dem strukturellen Aufbau der Zelle dienen, lange bekannt sind, wurde letztere Aufgabe vergleichsweise spät erkannt und ist seitdem unter dem Begriff *lipid signaling* Gegenstand teils kontroverser wissenschaftlicher Forschung.<sup>[11]</sup> Im Zuge dessen wurden, neben nur wenig verwandten Sphingomyelinasen aus Bakterien, bislang fünf humane Sphingomyelinase-Gene beschrieben, deren Produkte ganz unterschiedliche Eigenschaften besitzen. Ihre auffällige Vielfalt weist auf eine Spezialisierung der einzelnen Isoenzyme hin. Sie unterscheiden sich im pH-Optimum, ihrer Abhängigkeit von der Anwesenheit divalenter Kationen, gewebetypischen Expressionsmustern und subzellulärer Lokalisation (Tab. 1-1).<sup>[12]</sup>

Tab. 1-1 | Überblick über die bekannten humanen Sphingomyelinasen, ihre Lokalisation, ihr pH-Optimum, ihre Regulation und Pathobiologie.

Gen	Isoenzym	Lokalisation	pH	Inhibitor	Aktivator	Defekt (Hinweise)	Lit.
SMPD 1	lysosomale saure Sphingomyelinase (l-ASM)	Lysosom	5.0	Inosit-phosphate, tricyclische Anti-depressiva	-	Morbus NIEMANN-PICK, (Depression)	[13-16]
SMPD 1	sekretierte saure Sphingomyelinase (s-ASM)	extrazellulär	5.0	Bisphosphonate	Zn <sup>2+</sup> , $\alpha$ -FAS, UV-C-Strahlung	(Arteriosklerose, Lungen-ödeme)	[17-19]
SMPD 2	neutrale Sphingomyelinase 1	ER, alle Gewebe	7.4	-	Mg <sup>2+</sup> ,	-	[20]
SMPD 3	neutrale Sphingomyelinase 2	Zellmembran, v.a. im Hirn	7.4	EDTA Spiroepoxid	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup>	(Minderwachstum, hormonelle Störungen, Knochenabnormitäten)	[21,22]
SMPD 4	neutrale Sphingomyelinase 3	ER, GOLGI, v.a. in Muskelzellen	7.4	Scyphostatin	Mg <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> PtdS, TNF	(Herzmuskel-leiden)	[23]
NPP7	alkalische Sphingomyelinase	extrazellulär in Darm und Leber	8.5	Zn <sup>2+</sup> , VO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , ATP, Imidazol	Gallensalze	(Darmkrebs)	[24]

### 1-1-3 | Saure Sphingomyelinase

Wie aus Tab. 1-1 ersichtlich, wurde nachgewiesen, dass mindestens das SMPD1-Gen für die saure Sphingomyelinase (ASM) durch verschiedene Reifungs- und Transportprozesse

zwei unterschiedliche funktionale Proteine mit annähernd gleicher Molekülmasse von etwa 72 kD liefert.<sup>[17,25]</sup> Das eine Enzym, lysosomale ASM (l-ASM), bewirkt im Lysosom den konstitutiven Abbau des Membranbestandteils Sphingomyelin. Das andere (s-ASM) wird auf die Zelloberfläche sekretiert und bedarf anders als das lysosomale Enzym zur Entfaltung seiner Aktivität der Zugabe von  $\text{Zn}^{2+}$ .<sup>[26]</sup> Eine verstärkte Sekretion wird zudem als Antwort auf verschiedene Stimuli (UV-C-Strahlung,  $\alpha$ -FAS)<sup>[27,28]</sup> beobachtet. Nach wie vor ist die biologische Funktion der Sekretion nicht abschließend aufgeklärt, da außerhalb der Zelle normalerweise Bedingungen herrschen, bei denen das Enzym *in vitro* wenig Aktivität aufweist (neutraler pH, geringe  $\text{Zn}^{2+}$ -Konzentrationen).

Die stimulierte Sekretion von ASM legt nahe, dass die extrazelluläre Sphingomyelin-Hydrolyse Teil des sogenannten *lipid signaling* ist, also der Signaltransduktion mit Lipid-Botenstoffen. Tatsächlich lieferten Experimente unter Zugabe exogener ASM<sup>[29]</sup> oder des ASM-Produktes Ceramid<sup>[30]</sup> Hinweise darauf, dass durch ASM-Aktivität gebildete Ceramide die beobachteten *downstream*-Effekte hervorrufen. Dabei erweist sich das Vorhandensein von s-ASM als notwendig für die Bildung Ceramid-reicher Membranamikrodomänen, die eine Plattform auf der Zelloberfläche bilden, die z.B. zur Oligomerisierung von Fas-Rezeptoren, nachfolgender Bildung des sogenannten *death-inducing signaling complex* und schließlich zur Apoptose führen.<sup>[27]</sup> Zur Erklärung der geschilderten Beobachtungen wird einerseits das Vorhandensein lokal acidifizierter Reaktionsgruben auf der Zelloberfläche und andererseits eine gewebeweite Senkung des pH-Wertes im Rahmen entzündlicher Prozesse diskutiert. Folglich kommt der sauren Sphingomyelinase eine Schlüsselrolle in der Weiterleitung proapoptotischer Signale durch die Bildung von Ceramiden zu, die es noch gezielter im natürlichen Kontext zu studieren gilt.

Besonders deutlich tritt die physiologische Bedeutung der ASM beim Krankheitsbild der Lipidose Morbus NIEMANN-PICK Typ A und B zutage.<sup>[31,32]</sup> Diese Krankheit wurde 1914 durch den Berliner Kinderarzt A. NIEMANN erstmals dokumentiert und durch L. PICK histologisch charakterisiert.<sup>[33]</sup> Dabei führt eine rezessiv ererbte Defizienz funktionaler saurer Sphingomyelinase zur Anreicherung nicht abgebauten Sphingomyelins in großen Speichervesikeln. Je nach Restenzymaktivität werden verschiedene Schweregrade unterschieden: Typ A mit schwerer Hepatosplenomegalie und rasch fortschreitender psychomotorischer Retardierung, die im Alter von 2-3 Jahren zum Tode führt; der

leichtere Typ B, bei dem vor allem eine Schädigung der Lunge zum Tod im frühen Erwachsenenalter führt; und weitere Typen mit anderer Entstehungsursache. Sie sind derzeit unheilbar, eine Enzyersatztherapie für Typ B befindet sich in einer frühen Testphase.<sup>[34]</sup> Die verminderte Aktivität von NIEMANN-PICK-assoziierten ASM-Varianten kann *in vitro* nur zum Teil nachvollzogen werden,<sup>[35]</sup> was die Diagnose der Krankheit erschwert. Zu Studienzwecken wurde ein Tiermodell entwickelt. Dazu wurde durch Insertion eines Neomycin-Resistenzgens in das entsprechende SMPD1-Gen ein Mäusestamm erzeugt, der keine ASM-Aktivität mehr aufweist (*knockout*, KO).<sup>[9]</sup> Homozygote ASM-KO-Mäuse entwickeln sich zunächst unauffällig, entwickeln mit einem Lebensalter von 8-10 Wochen aber zunehmend NIEMANN-PICK-typische Symptome (neuromotorische Defizite und Hepatosplenomegalie), die mit etwa vier Monaten zum Tode führen.

Auch die gegenteilig erhöhte Aktivität und Sekretion der ASM werden mit verschiedenen akuten und chronischen Leiden assoziiert. Ohne die Ursache aufzuklären, wies schon 1989 die Arbeitsgruppe SANDHOFF nach, dass Urin von Patienten mit akuter Bauchfellentzündung eine über 200-fach erhöhte ASM-Konzentrationen aufweist.<sup>[36]</sup> Ein Zusammenhang mit entzündlichen Vorgängen und vermehrter Apoptose liegt darum auf der Hand. Ferner wurde im Jahr 2008 gezeigt, dass die Anfälligkeit von Patienten mit cystischer Fibrose gegenüber bakterieller Lungeninfektion durch ASM vermittelt wird.<sup>[37]</sup> Aufgrund unterschiedlicher pH-Optima der Ceramid-bildenden ASM und der Ceramid-abbauenden sauren Ceramidase führt dabei ein erhöhter lysosomaler pH-Wert zu einer gegenüber der sauren Ceramidase relativ erhöhten Aktivität der ASM. Durch dieses Ungleichgewicht steigt die Konzentration von Ceramid. Dieses bewirkt den Tod von Zellen des Lungenepithels, was den Nährboden für bakterielle Lungeninfektionen bereitet. Dies wurde durch Experimente mit heterozygoten ASM-KO-Mäusen und durch pharmakologische Inhibition belegt.<sup>[38]</sup> Ein anderer Fall liegt bei akutem Lungenversagen vor. Dort führt eine bakterielle Infektion zu einer absoluten Steigerung der ASM-Aktivität,<sup>[19,39]</sup> die im weiteren Verlauf eine Schädigung des Lungengengewebes hervorruft. Auch hier vermindert eine genetisch bedingte ASM-Defizienz oder die pharmakologische Inhibition des Enzyms deutlich die Symptome.<sup>[18]</sup> Apoptotische und nekroptotische Vorgänge wurden mehrfach mit vermehrter ASM-Aktivität und erhöhten Ceramid-Spiegeln in Verbindung gebracht.<sup>[30,40]</sup> Ferner konnte gezeigt werden, dass sekretierte ASM auch bei neutralem pH-Wert *low density lipoprotein* (LDL) zu

hydrolysieren vermag, sofern dieses durch Oxidation, Phospholipase-Aktivität oder Anreicherung von Apolipoprotein CIII modifiziert wurde.<sup>[25]</sup> So gebildetes Ceramid begünstigt die Bildung von subendothelialen LDL-Aggregaten, was einen Schlüsselschritt bei der Initiation der Arteriosklerose darstellt.

Auch im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen wird eine Rolle der ASM diskutiert. So führen viele etablierte Krebstherapien durch die Gabe von Chemotherapeutika<sup>[41]</sup> oder Bestrahlung<sup>[42,43]</sup> zu einer vermehrten extrazellulären Ceramid-Bildung, wodurch das Absterben der malignen Zellen bewirkt werden soll. In diesem Zusammenhang erscheint es vielversprechend, den Effekt durch die Erhöhung der ASM-Aktivität zu steigern<sup>[44]</sup> und tatsächlich können Gliom-Tumorzellen durch Überexpression von ASM für Chemotherapeutika sensibilisiert werden.<sup>[43]</sup> Im umgekehrten Fall führt die Bestrahlung ASM-defizienter KO-Mäuse zu weniger Ceramid-vermitteltem Zelltod als bei WT-Mäusen. Dieser Effekt wird jedoch nur in einigen Geweben beobachtet und verhindert vor allem die drastischen Nebenwirkungen hoher Strahlungsdosen (*gastrointestinal acute radiation syndrome*), die eine Radiotherapie beschränken.<sup>[42]</sup> Von einem weiteren Einfluss der ASM auf Tumore berichtet die Arbeitsgruppe GULBINS.<sup>[45]</sup> Sie wies nach, dass die Metastasierung von Melanomen in ASM-defizienten Mäusen stark vermindert ist. Wurden jedoch zusätzlich WT-Thrombozyten transplantiert, so wurde die schützende Wirkung aufgehoben. Den gleichen Effekt hatte die Behandlung der Melanom-Zellen mit ASM oder deren Produkt Ceramid. Durch weitere Tests konnte nachgewiesen werden, dass Melanom-Zellen nur an der Gefäßwand haften und Metastasen bilden können, indem sie Thrombozyten zur Sekretion von ASM veranlassen. Erst dies erlaubt die Bildung von Ceramid auf der Oberfläche der Melanom-Zellen, sodass Integrine dort *cluster* bilden, die letztendlich zur Zelladhäsion führen. Interessanterweise ist nur die Metastasierung in den ASM-defizienten KO-Mäusen vermindert, das Tumorwachstum hingegen ist sogar beschleunigt.

Viele Pharmaka, z.B. Desipramin, Imipramin oder Amitriptylin, sind kationische amphiphile Verbindungen (*cationic amphiphilic drugs*, CADs), welche über eine protonierbare Gruppe verfügen, die eine Anreicherung in sauren Zellkompartimenten bewirkt. Diese Verbindungen führen zur einer unspezifischen Inhibition der ASM<sup>[46]</sup> und anderer lysosomaler Enzyme, die sich in einer Phospholipidose manifestieren kann. In Studien konnte gezeigt werden, dass besonders in Tumorzellen die Sphingolipid-

Zusammensetzung der Lysosomen durch CADs verändert wird, was zu einer Permeabilisierung der Lysosomen und nachfolgendem nicht-apoptotischem Zelltod führt.<sup>[47]</sup> Diese Erkenntnisse könnten in Zukunft helfen, die zugrundeliegenden Prozesse zu verstehen und zu nutzen, um neue Methoden zur Behandlung von Tumorerkrankungen zu entwickeln. Zusammenfassend scheint die Inhibition der ASM-vermittelten Ceramid-Bildung nach bisherigem Kenntnisstand also

- 1.) die Apoptose von Apoptose-kompetenten Zellen zu vermindern
- 2.) vor Metastasierung zu schützen
- 3.) nicht-apoptotischen Zelltod in Apoptose-inkompetenten Tumorzellen zu bewirken.

Der Fakt, dass viele CADs tricyclische Antidepressiva sind,<sup>[46]</sup> führte zu Spekulationen inwiefern nicht nur Tumorerkrankungen, sondern auch das Auftreten depressiver Störungen mit der ASM-Aktivität zusammenhängen. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die antidepressive Wirkung dieser Verbindungen eine direkte Folge der ASM-Inhibition ist.<sup>[48]</sup> All dies macht die ASM zu einem interessanten *drug target* und unterstreicht die Wichtigkeit der Unterscheidung zwischen sekretierter und lysosomaler ASM. Aufgrund der geschilderten physiologischen Bedeutung der ASM besteht fort-dauerndes Forschungsinteresse, obwohl sie bereits die am Besten charakterisierte humane Sphingomyelinase ist. Neben der bereits erwähnten Züchtung eines ASM-defizienten Mausmodells, gelang GORELIK *et al.* kürzlich ein weiterer Durchbruch mit der lange erwarteten Bestimmung der Kristallstruktur der murinen ASM<sup>[49]</sup> im Komplex mit dem in der Arbeitsgruppe ARENZ entdeckten hydrolyseresistenten ASM-Inhibitor 1-Aminodecan-1,1-bisphosphonsäure.<sup>[18]</sup> Diese Daten ermöglichen erstmals ein rationales Design neuer und selektiver Inhibitoren und erlauben Rückschlüsse auf den katalytischen Mechanismus der Sphingomyelin-Hydrolyse. Die Studie liefert Hinweise darauf, wie die Konformation der *N*-terminalen Saposin-Domäne des Enzyms die Bindung des Substrats steuert und worauf die beobachtete Substratspezifität beruht. Ferner wurden kationische Aminosäureseitenketten in der Sequenz identifiziert, die eine Anbindung des Enzyms an die anionischen Lipide der inneren Lysosomenmembran erlauben und ebenfalls notwendig für die katalytische Aktivität der ASM sind. Dieser Fakt steht im Einklang mit der oben beschriebenen Beobachtung, dass CADs eine unspezifische Inhibition der ASM bewirken,<sup>[46]</sup> indem sie sich im Lysosol anreichern, den Kontakt zu

anionischen Membranlipiden blockieren und so die funktionale Inhibition verschiedener lysosomaler Enzyme bewirken.

### 1-1-4 | Etablierte Sphingomyelinase-Assays

Die möglichst empfindliche und selektive Bestimmung der ASM-Aktivität in biologischem Material (Gewebehomogenat, Serum, Urin *etc.*) ist eine der Voraussetzungen für ein detailliertes Studium des Enzyms und für die Suche nach pharmakologischen Inhibitoren. Dazu stehen verschiedene Assays<sup>b</sup> zur Auswahl. Sie unterscheiden sich in ihrer Robustheit und Skalierbarkeit sowie im apparativen, personellen und finanziellen Aufwand. Beispielsweise sind radioaktive Techniken meist sehr empfindlich, aber relativ aufwändig. Photometrische Methoden sind dagegen oft gut skalierbar und günstig, aber wenig selektiv. Aus diesen Gründen bedarf es eines gewissen Methodenarsenals, um das Spektrum möglicher Anwendungen (klinische Diagnostik, Produktqualitätssicherung, Forschung) abzudecken. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal besteht in der Differenzierung zwischen homogenen und heterogenen Assays; letztere erfordern gewisse Separations- oder Transferschritte (Mediumtausch, Extraktion *etc.*) während homogene Assays ohne diese zusätzlichen Operationen auskommen (*mix and measure*). Damit geht die Möglichkeit einer Echtzeit-Verfolgung der Reaktion einher. Aus Platzgründen sei an dieser Stelle auf weiterführende Literatur zum Thema verwiesen,<sup>[50–52]</sup> das hier nur beispielhaft anhand einiger Assays zum Nachweis der Aktivität der sauren Sphingomyelinase (ASM) erläutert werden soll.<sup>[53]</sup>

Historisch betrachtet, erfolgte die Charakterisierung der Sphingomyelinasen gegen 1940 zunächst mittels Isolation und Quantifizierung ihrer Reaktionsprodukte.<sup>[54]</sup> Dieses aufwändige Verfahren wurde 1965 durch radiochemische Techniken abgelöst, die im Cholinanteil <sup>14</sup>C-markiertes Sphingomyelin als Substrat verwendeten (Abb. 1-3).<sup>[55]</sup> Diese Methode erlaubte erstmals eine schnelle Messung der Aktivität von Enzympräparationen und eine systematische Charakterisierung der ASM. Bis heute wird eine Modifikation dieses Assays verwendet, denn ein einzigartiger Vorteil der Radiomarkierung ist die Verwendung eines Substrats, welches sich biologisch exakt wie sein natürliches Pendant

---

<sup>b</sup> Ein Assay oder Test ist im Allgemeinen eine Methode zum Nachweis der Anwesenheit, der relativen oder absoluten Menge oder der Aktivität eines Analyten in einer Probe. Im deutschen Sprachraum sind damit vor allem biochemische Nachweismethoden gemeint, die unter anderem immunologische, radiochemische, spektroskopische und mikrokolorimetrische Verfahren umfassen.<sup>[50]</sup>

verhält. Nach wie vor gilt dieser Assay deshalb als Goldstandard, etwa für enzymkinetische Messungen der Sphingomyelinasen. Das radioaktiv markierte Substrat ist zu nicht unerheblichen Kosten kommerziell verfügbar. Neben dem Preis und den hohen Sicherheitsanforderungen leidet dieser Assay aber auch unter der Notwendigkeit eines wässrig/organischen Trennschrittes, er ist also heterogen. Neuere Versuche der Substitution dieses Trennschrittes zur Entwicklung eines Hochdurchsatzformates waren nur mäßig erfolgreich.<sup>[56]</sup>

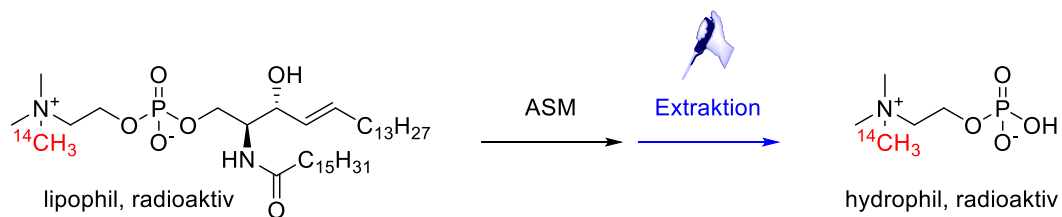


Abb. 1-3 | Prinzip des radioaktiven ASM-Assays | Isotopen-markiertes Sphingomyelin wird durch ASM-Aktivität zu wasserlöslichem  $^{14}\text{C}$ -Phosphorylcholin hydrolysiert. Das Ausmaß der Hydrolyse kann nach Extraktion des Produkts mit einem Szintillationsdetektor bestimmt werden. rot: Markierung, blau: manueller Arbeitsschritt.

Die katalytische Hydrierung der Doppelbindung von Sphingosin mit  $^3\text{H}_2$  nach SANDHOFF *et al.*<sup>[57]</sup> ergibt radiomarkiertes Dihydrosphingomyelin, das eine Trennung der ASM-Reaktionsprodukte mittels Dünnschichtchromatographie (DC) zum Zwecke des Enzymnachweises erlaubt.<sup>[58]</sup> Radiomarkierte Sphingolipide eignen sich auch zur Bestimmung der ASM-Aktivität *in situ*. So berichteten LEVADE *et al.* 1996 etwa von radiographischen Analyse der ASM-Aktivität in lebenden Zellen durch die Verwendung von  $^3\text{H}$ -markiertem Sphingomyelin.<sup>[32]</sup>

Aufgrund der hohen Ausrüstungsansprüche radiochemischer Arbeiten bestand schon früh ein Bedarf an alternativen Methoden. Die Arbeiten zur Bestimmung der ASM-Aktivität durch Verfolgung des Umsatzes mittels Dünnschichtchromatographie wurden deshalb später weiterentwickelt, indem anstelle radioaktiv markierter Substrate fluoreszent markierte Verbindungen eingesetzt wurden. Zur Markierung diente ein Nitrobenzoxadiazol (NBD) im Fettsäure-Teil von Sphingomyelin.<sup>[59]</sup> Eine Fortführung dieses Ansatzes mündete im Jahre 2012 im Nachweis der Aktivität einer neutralen Sphingomyelinase mittels HPLC anstelle von DC.<sup>[60]</sup> Neuere Arbeiten nutzen auch verkürztes synthetisches Sphingomyelin zur Bestimmung der ASM-Aktivität mittels Massenspektrometrie-gekoppelter Flüssigkeitschromatografie (LC-MS).<sup>[61]</sup>





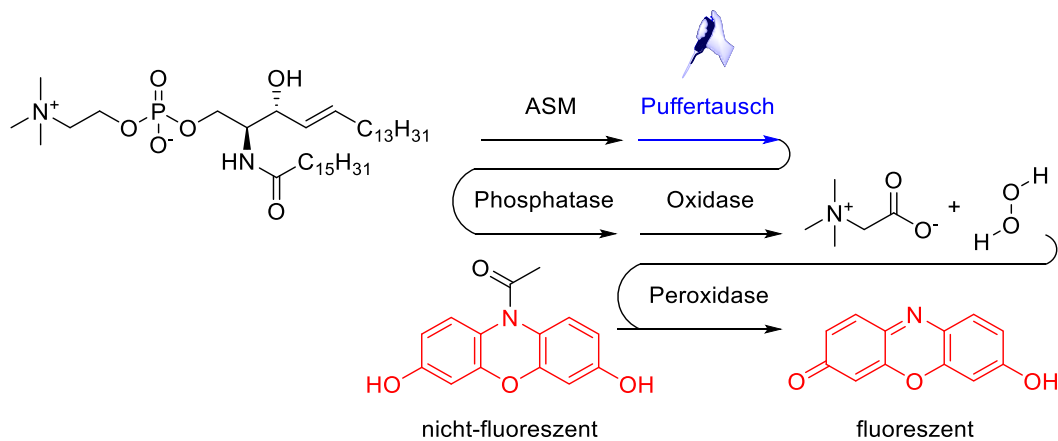


Abb. 1-5 | Prinzip des Amplex®Red-Assays | Natürliches Sphingomyelin wird durch ASM-Aktivität und Folgereaktionen zu Betain und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt, deren Bildung über die Freisetzung von Resorufin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on) verfolgt werden kann. rot: Markierung, blau: manueller Arbeitsschritt, Erläuterung im Text.

Ein alternativer Ansatz (Abb. 1-5) erlaubt durch die Kopplung mehrerer enzymatischer Reaktionen eine indirekte fluorimetrische Bestimmung der ASM-Aktivität. Dazu wird das Phosphorylcholin, welches die ASM-katalysierte Sphingomyelin-Hydrolyse freisetzt, durch alkalische Phosphatase zu Cholin hydrolysiert und dieses durch Cholin-Oxidase zu Betain und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt. Letzteres reagiert unter Vermittlung durch Meerrettich-Peroxidase mit dem fluorogenen Reagenz 10-Acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin (Amplex®Red) zu Resorufin (siehe Seite 33, Abb. 1-17), dessen Bildung fluorimetrisch quantifiziert werden kann.<sup>[29,66]</sup> Die Methode erlaubt eine kontinuierliche Quantifizierung der Sphingomyelin-Hydrolyse im Mikrotiterplattenformat und kann prinzipiell als homogener Assay bezeichnet werden. Dies gilt allerdings nicht für die saure Sphingomyelinase, deren saures pH-Optimum mit den Anforderungen der anderen verwendeten Enzyme inkompatibel ist. Der deshalb erforderliche Pufferwechsel erlaubt nur diskontinuierliche Messungen. Zudem ist fraglich, inwieweit etwaige biologische Begleitkomponenten des verwendeten ASM-Präparates das komplexe Zusammenspiel der in diesem Assay verwendeten Enzyme stören.

Zur Entwicklung eines heterogenen Fluoreszenz-basierten ASM-Assays synthetisierten GAUDINO *et al.* mittels Phosphoramidit-Methode drei Sphingomyelin-Analoga, welche in der Cholin-Kopfgruppe fluorescent markiert wurden.<sup>[67]</sup> Zwei dieser Verbindungen waren zudem zur Immobilisierung mit einem Biotin-Anker ausgestattet (Abb. 1-6).

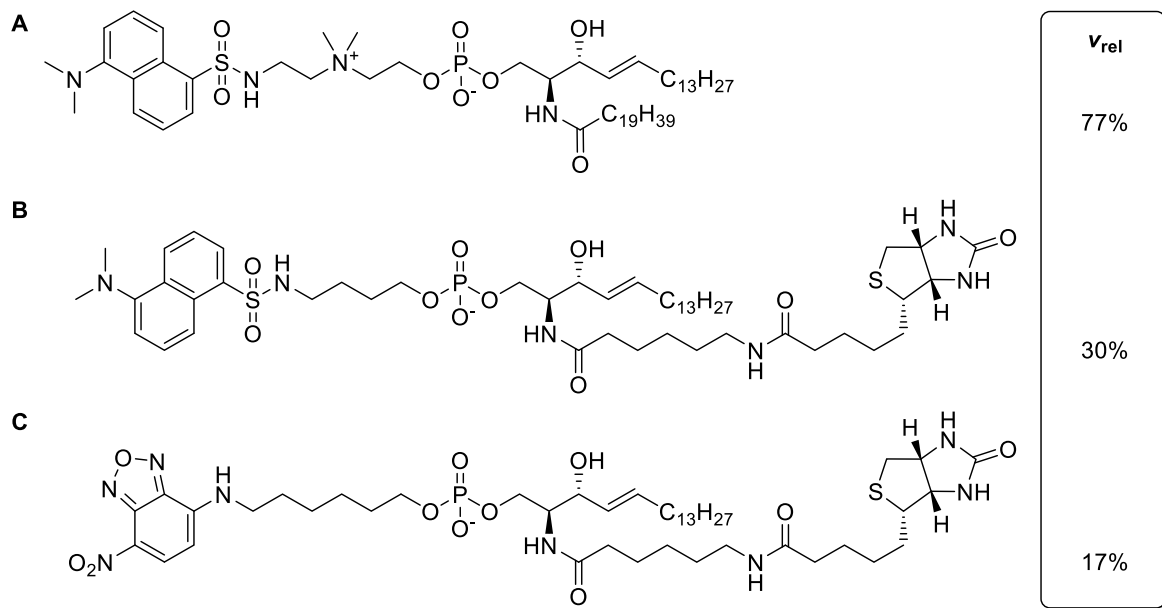


Abb. 1-6 | **A** | Dansyl-, **B** | Dansyl-/Biotin- und **C** | NBD-/Biotin-markierte Sphingomyelin-Analoga nach GAUDINO *et al.*,<sup>[67]</sup>  $v_{rel}$  = relative ASM-Hydrolysegeschwindigkeit bezogen auf <sup>14</sup>C-Sphingomyelin.

Es zeigte sich, dass die zum natürlichen Substrat Sphingomyelin isolelektrische und im Fettsäureteil unmodifizierte Verbindung **A** erwartungsgemäß am schnellsten durch ASM verstoffwechselt wird. Aber auch die mit einem Biotin-Anker modifizierten Derivate **B** und **C** wiesen akzeptable Hydrolyseraten auf, die etwa drei- bis sechsmal kleiner als die des natürlichen Substrats ausfallen. Eine Analyse der Struktur-Wirkungsbeziehung ist aufgrund der geringen Zahl untersuchter Derivate kaum möglich, jedoch kann festgehalten werden, dass die saure Sphingomyelinase alle drei Substrate erkennt und einen funktionalen Assay prinzipiell erlaubt. Auch Modifikationen der Kopfgruppe mit deutlich größerem Raumanspruch (im Vergleich zu Cholin) werden toleriert. Die Autoren weisen zudem auf die Bedeutung der positiv geladenen Ammoniumgruppe des natürlichen Sphingomyelins für die Substraterkennung des Enzyms hin. Zugleich zeigen die Daten jedoch, dass die Anwesenheit dieser Gruppe nicht zwingend erforderlich ist. Folgestudien wurden nicht publiziert, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass das Material den bisherigen Methoden unterlegen war.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass trotz über 50 Jahren Forschung bislang kein homogener ASM-Assay etabliert werden konnte. Die vor Kurzem erfolgte röntgenographische Charakterisierung des Enzyms<sup>[49]</sup> liefert erstmals eine belastbare strukturelle Grundlage für eine gezielte Synthese pharmakologisch interessanter Inhibitoren der ASM (*rational drug design*). Damit steigt auch die Nachfrage nach einem hochdurchsatzfähigen, homogenen Assay, um diese neuen Substanzen effizient evaluieren zu können.

## 1-2 | Biosynthese von Sphingosin

Der chirale Aminoalkohol Sphingosin ((2*S*,3*R*,4*E*)-2-Aminooctadec-4-en-1,3-diol)<sup>[68]</sup> bildet das Rückgrat der Sphingolipide, einer mehr als 300 verschiedene Vertreter umfassenden Naturstoffklasse.<sup>[11]</sup> Wie in Abb. 1-7 dargestellt, wird er über eine mehrstufige Reaktionsfolge aus L-Serin und Palmitoyl-CoA aufgebaut.<sup>[4]</sup> Die Biosynthese beginnt an der zytosolischen Seite des endoplasmatischen Retikulums (ER) mit einer initialen C-C-Knüpfung zwischen L-Serin und Palmitoyl-Coenzym A durch die Pyridoxal-phosphat-abhängige Serin-Palmitoyltransferase.<sup>[4]</sup> Dies ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, über den die *de-novo*-Biosynthese von Sphingolipiden reguliert wird. Wie in Abb. 1-7 weiter gezeigt, schließen sich daran eine stereoselektive Reduktion der Carbonylfunktion durch die 3-Ketosphinganin-Reduktase, die Übertragung eines Acyl-Restes auf die sekundäre Aminofunktion durch die Sphinganin-*N*-Acyltransferase und eine *trans*-selektive 4,5-Dehydrierung durch die Dihydroceramid-Desaturase an.<sup>[69]</sup> Das so gebildete Ceramid wird im Lumen des GOLGI-Apparates durch die bereits erwähnte Sphingomyelin-Synthase mittels Übertragung der Phosphorylcholin-Kopfgruppe eines Phosphatidylcholins<sup>c</sup> in Sphingomyelin überführt. Dieses wird anschließend durch vesikulären Transport (Exozytose) in die äußere Zellmembran integriert, wo es seine strukturbildende Funktion ausübt.

Der konstitutive Abbau von Sphingomyelin erfolgt durch Einstülpung der Zellmembran und Abschnürung von Vesikeln (Endozytose). Die Vesikel verschmelzen mit Endosomen und Lysosomen, wodurch der pH-Wert in ihrem Inneren sinkt. Dadurch werden sukzessive verschiedene Hydrolasen aktiviert, die den Abbau der endozytierten Komponenten bewirken. Unter Vermittlung durch anionische Membranlipide<sup>[70]</sup> wie etwa BMP (Bis(monoacylglycero)phosphat) bindet nun die saure Sphingomyelinase das Sphingomyelin und hydrolysiert es zu Ceramid, welches seinerseits durch die saure Ceramidase zu Sphingosin verstoffwechselt wird. Folglich ist freies Sphingosin nicht die Vorstufe, sondern vielmehr ein Abbauprodukt der Sphingolipide. Tatsächlich ist der Pfad jedoch nicht so geradlinig, da einige Intermediate (z.B. Ceramide) auch Ausgangspunkt

---

<sup>c</sup> Phosphatide sind Derivate der 1,2-Diacyl-*sn*-glycerophosphorsäure.

zur Bildung vieler weiterer Sphingolipide sind und sie deshalb zurückgeführt werden (*salvage pathway*), bevor sie final abgebaut werden.

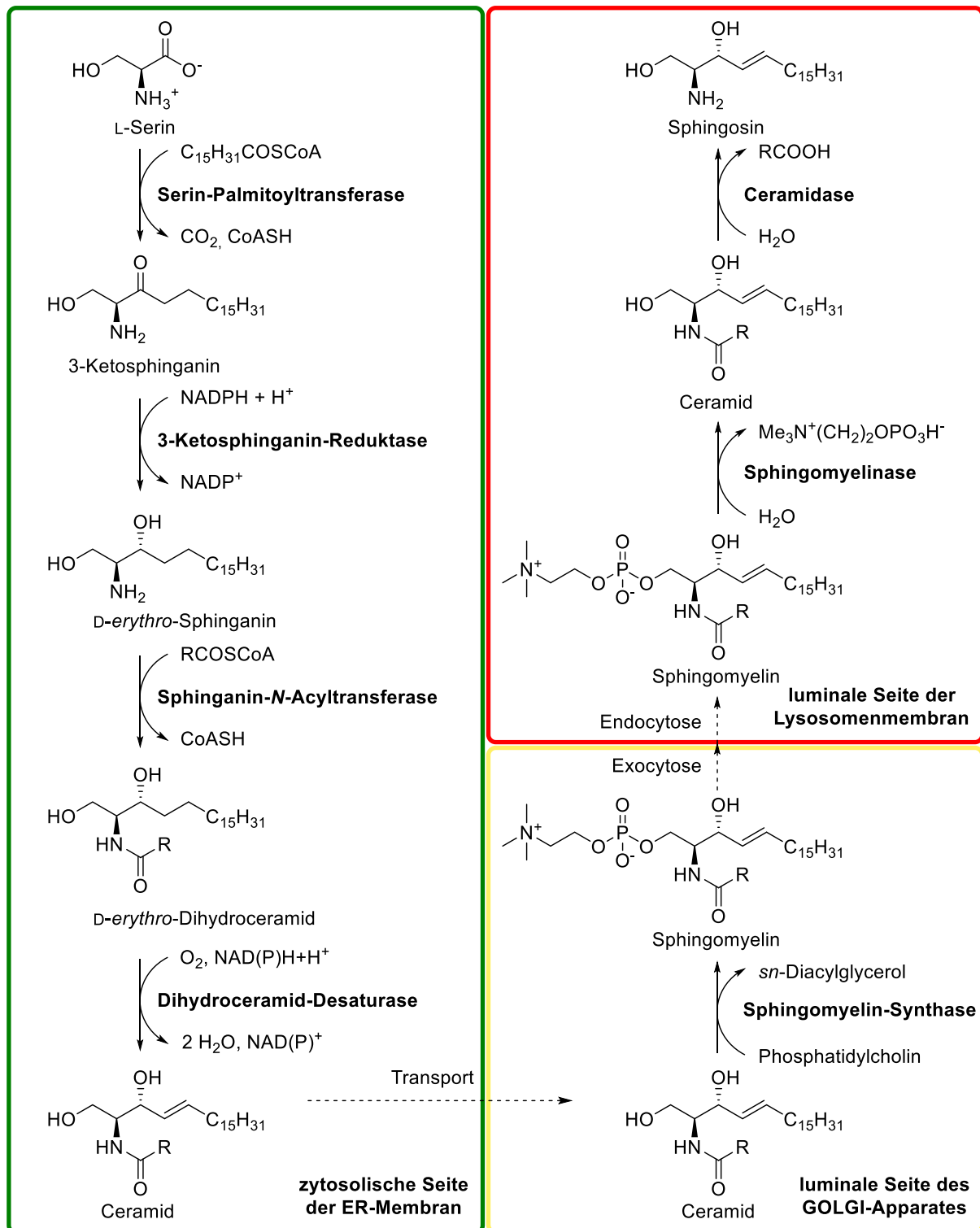


Abb. 1-7 | Biosynthese von Sphingosin nach KOLTER und SANDHOFF<sup>[4]</sup> | Der Aufbau von Ceramid erfolgt auf der zytosolischen Seite des ER (grün, links), der Aufbau von Sphingomyelin im GOLGI-Apparat (gelb, rechts unten) und der Abbau zu Sphingosin im Endosom/Lysosom (rot, rechts oben).

### 1-3 | Chemische Synthese von Sphingosin

Sphingolipide können aus biologischen Quellen (z.B. Hühnerei, Schweinehirn) gewonnen werden, allerdings ist das Verfahren aufwändig und liefert nur geringe Mengen. So gewonnene Ceramide sind zudem nicht molekular einheitlich, je nach Herkunftsgewebe variieren ihre Acylreste beträchtlich in Kettenlänge und Sättigungsgrad.<sup>[7]</sup> Um reines Sphingosin zu gewinnen, werden diese verschiedenen Acylreste durch Hydrolyse entfernt, jedoch führen die drastischen Reaktionsbedingungen zu Umlagerungsreaktionen,<sup>[71,72]</sup> wodurch komplexe Mischungen erhalten werden. Deshalb wurden schon vor vielen Jahrzehnten synthetische Zugänge zu monodispersen Material etabliert, das auf diesem Wege zusätzlich mit geeigneten Schutzgruppen dekoriert oder modifiziert werden kann.<sup>[73]</sup> Ausgangsmaterial sind in der Regel kleine Naturstoffe (L-Serin, D-Glucose, D-Xylose<sup>[74]</sup>) die zur Einführung der benötigten chiralen Information dienen. Kritische Punkte aller Synthesen sind die Einführung und Aufrechterhaltung der beiden stereogenen Zentren sowie der *trans*-Doppelbindung.

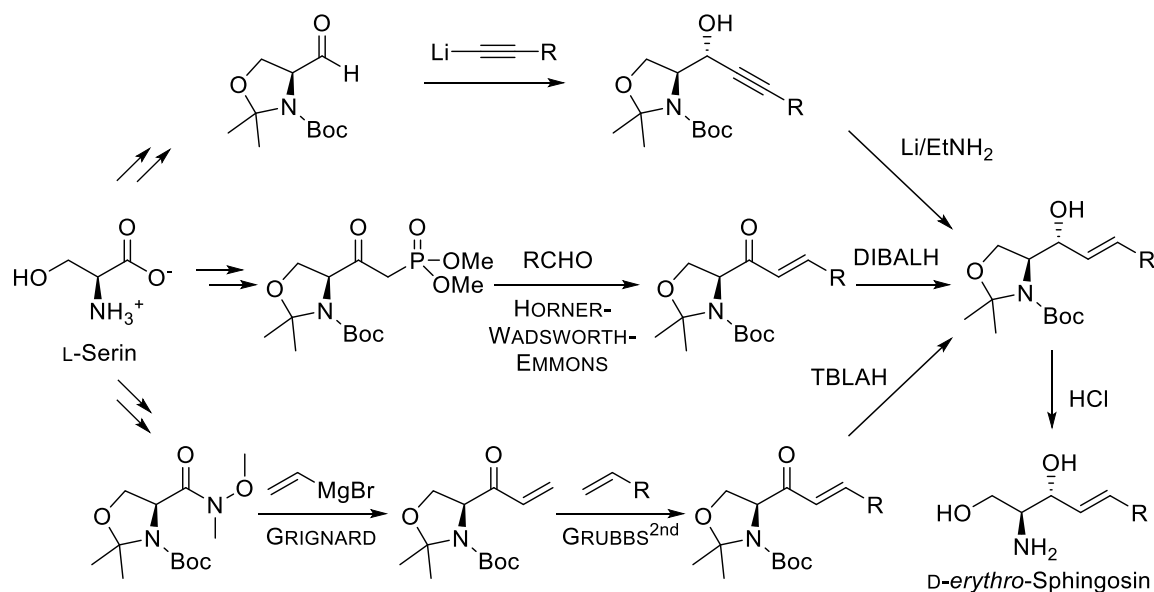


Abb. 1-8 | Ausgewählte, von L-Serin ausgehende Synthesen von naturidentischem Sphingosin über Serinale<sup>[75]</sup> (oben), 3-Ketophosphonate<sup>[73]</sup> (mittig) oder WEINREB-Amide<sup>[76]</sup> (unten).

Als historischer Meilenstein zum Aufbau synthetischer Sphingosin-Derivate können die Arbeiten von GARNER *et al.* aus dem Jahre 1988 gelten. Darin wurde eine stereoselektive Addition von Lithiumalkynylen an Serinale (Abb. 1-8, oben) und anschließende *trans*-selektive Reduktion der Dreifachbindung unter Erhalt der *threo*-Konfiguration gezeigt.<sup>[75,77]</sup> Die teils drastischen Reaktionsbedingungen (Li/EtNH<sub>2</sub>) beschränken die

Methode jedoch, speziell falls im Sphingosin-Rückgrat Modifikationen eingeführt werden sollen. Auch die *trans*-selektive HORNER-WADSWORTH-EMMONS-Reaktion eines ebenfalls von Serin abgeleiteten 3-Ketophosphonats kann zur Knüpfung der Doppelbindung dienen<sup>[73]</sup> (Abb. 1-8, mittig).

Mit der Entwicklung milder Olefinmetathese-Katalysatoren durch ROBERT H. GRUBBS<sup>[78]</sup> und andere stand ein weiteres nützliches Werkzeug zur Verfügung, um durch GRIGNARD-Additionen von Vinylmagnesiumbromid an WEINREB-Amide und anschließende stereoselektive Reduktion erhaltene Allylalkohole zu Sphingosin und vielfältigen Folgeprodukten (z.B. Ceramiden) umzusetzen (YAMAMOTO *et al.*<sup>[76]</sup>, Abb. 1-8, unten). Olefinmetathese-Katalysatoren können alternativ auch zum *scrambling* von Ceramiden mit geschützten  $\omega$ -Aminoalkenen eingesetzt werden, wodurch ein alternativer Weg zu fluoreszent markierten Sphingolipiden geöffnet wurde.<sup>[79]</sup> Weitere neue Zugänge zu Ceramiden sind WITTIG-Reaktionen von polymergebundenen Fluorenylmethoxycarbonylaminoacylphosphoranylidenacetaten,<sup>[80]</sup> allerdings ist die Variation im Sphingosin-Rückgrat bei dieser Methode bislang durch die drastischen Reaktionsbedingungen auf reine Kohlenwasserstoffreste beschränkt.

## 1-4 | Phosphor-haltige Biomoleküle – Bedeutung & Synthese

Die Phosphorylierung von Biomolekülen wie Zuckern, Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden bewirkt im Vergleich mit dem zugrundeliegenden Alkohol drastisch veränderte Eigenschaften. So werden etwa die Löslichkeit, die räumliche Struktur, das chemische Potential und die molekulare Erkennung durch die Einführung des anionischen Phosphatrestes radikal verändert. Deshalb dient diese Modifikation häufig der Funktionsregulation (Proteine, Lipide) oder Aktivierung für Folgereaktionen (Zucker). In der Mehrzahl der Fälle erfolgt die Biophosphorylierung indem eine Kinase einen Phosphatrest von Adenosintriphosphat (ATP) auf ein Substrat überträgt. Dies gilt insbesondere auch für Sphingolipide, deren Funktion durch Phosphorylierung der 1-OH-Gruppe reguliert wird. So wirkt Ceramid proapoptotisch, sein Antagonist Ceramid-1-phosphat hingegen mitogen.<sup>[81]</sup> Wie in Abb. 1-9 gezeigt, unterliegt auch Sphingosin einer solchen Regulation. So initiiert die durch Sphingosin-Kinase vermittelte Phosphorylierung von Sphingosin den Abbau des Sphingosin-Grundkörpers. In dessen Verlauf wird das gebildete Sphingosin-1-phosphat durch eine Sphingosin-1-phosphat-Lyase irreversibel zu 2-Aminoethylphosphat und Hexadec-2-enal gespalten.<sup>[4,82]</sup>

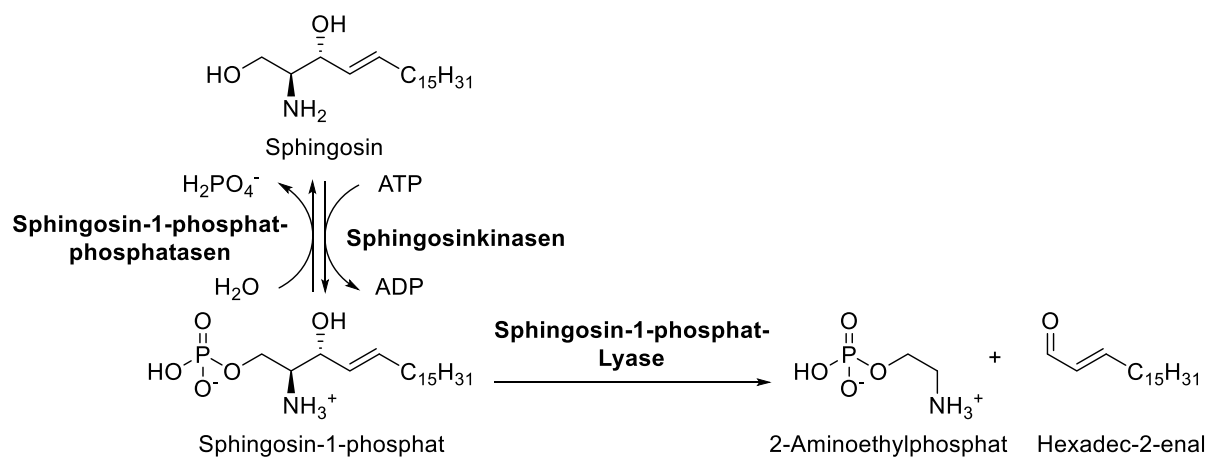
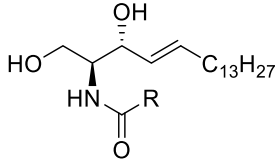
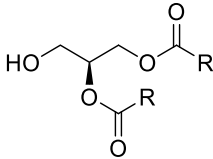
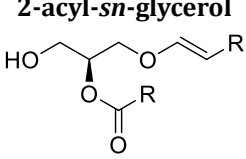
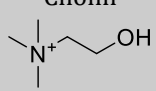
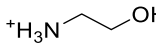
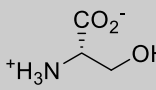


Abb. 1-9 | Der Abbau von Sphingosin wird durch die Phosphorylierung der 1-OH-Gruppe initiiert.

Werden phosphorylierte Verbindungen mit einem weiteren Alkohol kondensiert, werden Phosphodiester erhalten, die in biologischen Systemen häufig eine Strukturfunktion ausüben. Ein prominentes Beispiel dafür sind etwa DNS und RNS wo Phosphatreste zur Verknüpfung der Nukleoside dienen. Auch in Phospholipiden wie Sphingomyelin und Phosphatiden dient ein Phosphodiester zur kovalenten Verknüpfung zweier Alkohole, dort verbindet er die polare sogenannte Kopfgruppe und die unpolare sogenannte

Schwanzgruppe. Dadurch entstehen die in Tab. 1-2 gezeigten amphiphilen Moleküle.<sup>[83]</sup> Durch diesen modularen Aufbau wird eine große Zahl strukturell ähnlicher Lipide gebildet, deren relatives Verhältnis gewebsspezifisch ist.

Tab. 1-2 | Modularer Aufbau und strukturelle Ähnlichkeit<sup>d</sup> der humanen Phospholipide | Ein Phosphodiester verknüpft darin zwei Alkohol-Komponenten – die polare sogenannte Kopf- und die lipophile sogenannte Schwanzgruppe. Die Tabelle zeigt nur eine Auswahl der möglichen Kombinationen von jeweils drei häufigen Vertretern. R = var. Fettsäurerest.

<div style="display: inline-block; transform: rotate(-45deg);">Schwanzgruppe</div> <div style="display: inline-block; transform: rotate(45deg);">Kopfgruppe</div>	<b>Ceramid (Cer)</b> 	<b>Diacylglycerol (DAG)</b> 	<b>1-O-(1Z-alkenyl)-2-acyl-sn-glycerol</b> 
<b>Cholin</b> 	Sphingomyelin (SM)	Phosphatidylcholin (PtdC), auch Lecithin	Plasmenylcholin
<b>Ethanolamin</b> 	Ceramidphosphoethanolamin	Phosphatidylethanolamin (PtdE), auch Kephalin	Plasmenylethanolamin
<b>L-Serin</b> 	Ceramidphosphoserin	Phosphatidylserin (PtdS)	Plasmenylserin

Zum Aufbau und Studium der Eigenschaften der meist asymmetrischen, d.h. zwei verschiedene Alkohol-Komponenten verknüpfenden, Phosphodiester wurden in den vergangenen 100 Jahren immer selektivere und schonendere Methoden entwickelt.<sup>[85,86]</sup> Sie bildeten den Grundstein zu bedeutenden Neuerungen wie der automatisierten DNS-Synthese und leisten einen wichtigen Beitrag zur Erforschung physiologischer Prozesse, die noch lange nicht abgeschlossen ist. Während aufgrund reger Forschung zur Synthese von Oligo- und Polynukleotiden hocheffiziente Protokolle und Reagenzien zum Aufbau der beteiligten Phosphodiester existieren, ist die Methodenwahl für die Synthese von Phospholipiden vergleichsweise eingeschränkt. Ein Grund hierfür ist die größere strukturelle Komplexität, die geringere Verfügbarkeit der Ausgangsverbindungen sowie die amphiphile Natur der Phospholipide welche ihre Isolierung (z.B. durch Fällung) erschwert. Nur unter bestimmten Umständen (großer unpolarer Anteil, maskiertes Phosphat, sehr polare mobile Phase) ist eine Extraktion oder chromatographische Trennung möglich, Destillationen scheiden kategorisch aus. Offensichtlicher Ausweg ist

<sup>d</sup> Soll oder kann nicht zwischen Acyl-, Alkyl- oder 1-Alkenyl-Substituenten am Lipidrückgrat unterschieden werden, empfiehlt die IUPAC die Verwendung des Präfix Radyl-.<sup>[84]</sup>



die Festphasensynthese, da hier überschüssiges Reagenz leicht abgetrennt werden kann und eingeschränkte Löslichkeit ein untergeordnetes Problem darstellt. Deshalb ist zu erwarten, dass Phospholipid-Festphasensynthesen zukünftig an Bedeutung gewinnen werden. Erste Studien dazu sind bereits publiziert.<sup>[87]</sup>

Um asymmetrische Phosphodiester zu generieren, gehen faktisch alle Synthesemethoden auf zwei freie Alkohole zurück, die unter Verwendung eines Phosphorylierungsmittels sukzessive verknüpft werden.<sup>[86]</sup> Intrinsisches Problem dabei ist die Bildung symmetrischer Phosphodiester. Geeignete Möglichkeiten, ihre Bildung zu unterdrücken, bestehen darin, die effektive Konzentration der Alkoholkomponente zu verringern (Verdünnung, langsame Zugabe, Festphasenfixierung) oder sukzessive jeweils nur einfach aktivierte Phosphorsäure-Derivate zu erzeugen (*N,N*-Diisopropylchlorophosphoramidit, *H*-Phosphonat-Methode, schrittweise Zugabe von Aktivierungsreagenzien wie Tetrazol). Generell kann zwischen P(V)- und P(III)-Reagenzien unterschieden werden:

**Zu den P(V)-Methoden** zur Phosphodiester-Synthese zählen jegliche Formen der Kondensation die ein vom Phosphoroxychlorid ( $\text{POCl}_3$ ) abgeleitetes Derivat nutzen. Letztere können entweder durch direkte Substitution eines oder mehrerer Chlorid-Ionen (Phosphorodichloridate *etc.*) oder durch Aktivierung eines Phosphats erhalten werden. So gelingt in besonderen Fällen sogar die chemische Synthese von Phosphodiestern aus Phosphomonoestern und einem Alkohol. Diese formale Alkylierung bedarf starker Aktivierungsreagenzien wie Bromcyan, Carbodiimiden oder Trichloroacetonitril,<sup>[86,88]</sup> welche das bei der Reaktion formal gebildete Wasser irreversibel binden und die chemische Energie für die Reaktion bereitstellen. Die geringe Effizienz dieser Reaktion erfordert eine Vororientierung der beiden Reaktionspartner, was die Methode auf Polynukleotide beschränkt.

Die im Gegensatz dazu zügige Reaktion von Alkoholen mit Phosphoroxychlorid liefert formal Phosphorsäure(di)chloride. Diese sind jedoch sehr hydrolyseempfindlich, weshalb sie häufig direkt weiter umgesetzt werden. Mit Hinblick auf das für Phospholipide charakteristische Aminoethylphosphat-Motiv werden dazu häufig vicinale Diole oder Aminoalkohole zugegeben, um die reaktiven P-Cl-Gruppen abzusättigen (siehe Abb. 1-10). Dabei bilden sich cyclische Phosphotriester und -diesteramide (Oxazaphospholane und Dioxaphospholane).<sup>[89]</sup> Letztere können auch aus kommerziell verfügbarem 2-Chloro-1,3,2-dioxaphospholan-2-oxid gewonnen werden, welches in Anwesenheit einer

Base bereitwillig mit Alkoholen reagiert. Durch saure Hydrolyse können die Phospholan-Fünfringe zu Hydroxyethylphosphaten bzw. Aminoethylphosphaten geöffnet werden. Dioxaphospholane können alternativ auch durch den Angriff starker Nucleophile zu (Methyl)Aminophosphaten umgesetzt werden. Dazu sind oft Überdruck und hohe Überschüsse des Nucleophils erforderlich. Dies beschränkt die Methode fast gänzlich auf die Synthese von Phosphocholin-Derivaten, da hier mit Trimethylamin ein exzellentes Nucleophil eingesetzt wird, dessen Überschuss aufgrund seiner Flüchtigkeit nach der Beendigung der Reaktion leicht entfernt werden kann. Auch Bromid-Ionen können Dioxaphospholane bei geeigneter Reaktionsführung unter Bildung von Bromoethylphosphaten öffnen. Letztere können auch auf anderen Wegen gewonnen werden und liefern durch nucleophile Substitution ihrerseits (Methyl)Amine wie die biologisch bedeutsamen Phosphatidylcholine.

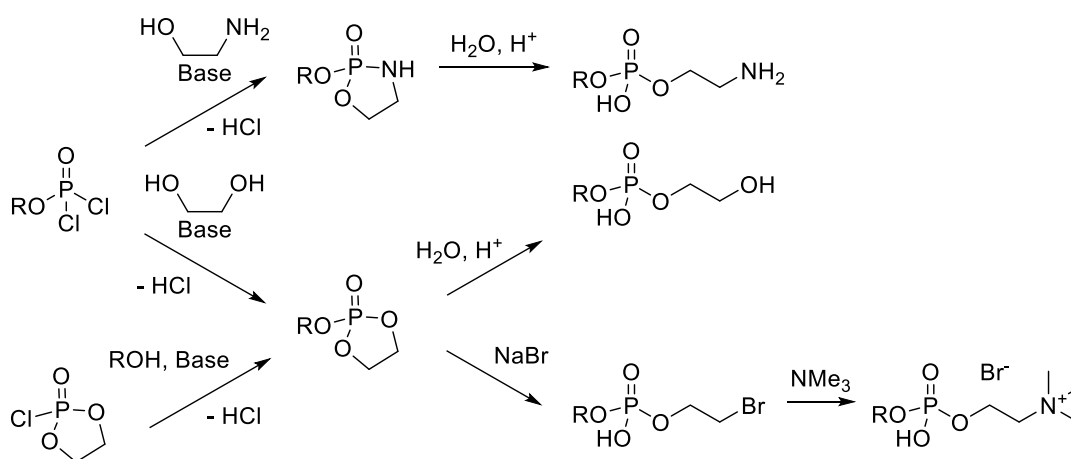


Abb. 1-10 | Phospholan-basierte Strategien zum Aufbau von Phospholipiden nach EIBL<sup>[89]</sup> | R = organischer Rest, häufig ROH = Dipalmitoylglycerol.

Interessante Arbeiten zur Synthese von Phospholipiden mit Aminoethylphosphat-Motiv erfolgten durch HIRT und BERCHTOLD,<sup>[90]</sup> denen durch die stufenweise Chlorid-Substitution an  $\text{POCl}_3$  die Synthese von Kephallinen in großem Maßstab gelang (siehe Abb. 1-11). Dazu stellten sie aus Phthalimid-maskiertem 2-Aminoethanol ein *O*-2-Phthalimidoethylphosphorodichloridat dar, dessen Aufreinigung und Isolation durch Kristallisation gelang.

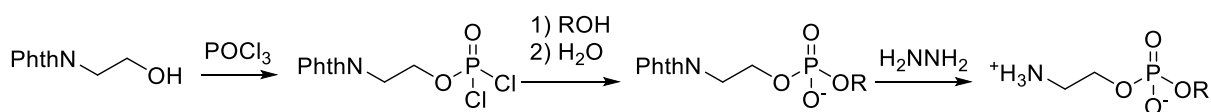


Abb. 1-11 | Phosphorodichloridat-Methode zum Aufbau von Kephalin-Analoga nach HIRT und BERCHTOLD<sup>[90]</sup> | ROH = Cetylalkohol, Cholesterol, Diacylglycerol.

Dieses Reagenz brachten sie in Anwesenheit einer Base unter wasserfreien Bedingungen mit einem Unterschuss eines Alkohols (z.B. Dipalmitoylglycerol) zur Reaktion und hydrolysierten anschließend die verbliebenen P-Cl-Gruppen. Durch Hydrazinolyse wurden aus den so gewonnenen Phthalimidoethylphosphorsäureestern final die gewünschten Kepheline und Kephalin-Analoga freigesetzt.

**Die P(III)-basierten Reagenzien** zeichnen sich durch eine hohe Chemoselektivität und ihre kommerzielle Verfügbarkeit aus, bedürfen aber milder Oxidationsmethoden um stabile Produkte zu generieren. Dazu sind  $I_2/H_2O/Pyridin$ , organische Peroxide ( $tBuOOH$ ) und Persäuren ( $mCPBA$ ) etabliert, jedoch sind einige funktionelle Gruppen nicht mit ihnen kompatibel. Besonders zu erwähnen sind die *H*-Phosponat-Methode sowie die Phosphoramidit-Methode.

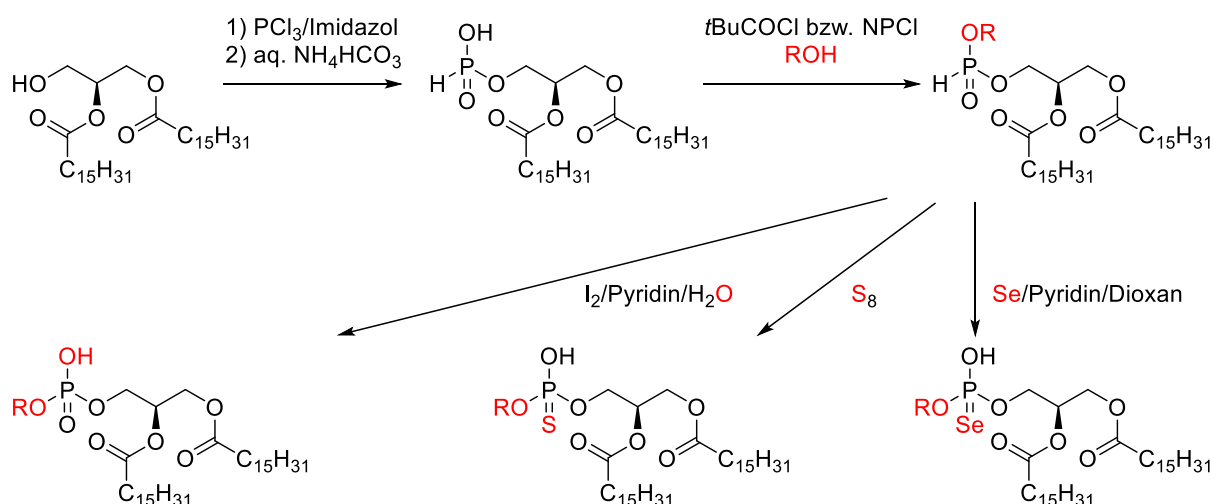


Abb. 1-12 | *H*-Phosponat-Methode zum Aufbau von Glycerophospholipiden nach LINDH und STAWINSKI<sup>[91]</sup> | NPCl = 2-Chloro-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxid.

So gelang etwa LINDH und STAWINSKI mittels *H*-Phosponat-Methode die Synthese von Phosphatiden aus Diacylglycerolen<sup>[91]</sup> (Abb. 1-12). Dazu wird ein Alkohol mittels  $PCl_3/Imidazol$  und anschließender wässriger Aufarbeitung in eine *H*-Phosphonsäure überführt, die mit 2-Chloro-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxid (NPCl) oder Pivaloylchlorid aktiviert und mit einem zweiten Alkohol kondensiert werden kann. Der Charme dieser Methode besteht darin, dass genügend lipophile *H*-Phosponate u.U. auch chromatographisch isoliert werden können und nach einer anschließenden Oxidationsreaktion mit wässrigem Iod direkt einen freien Phosphodiester liefern. Alternativ kann die Oxidation auch mit Schwefel oder Selen zu Thiophosphodiestern bzw. Selenophosphodiestern führen.

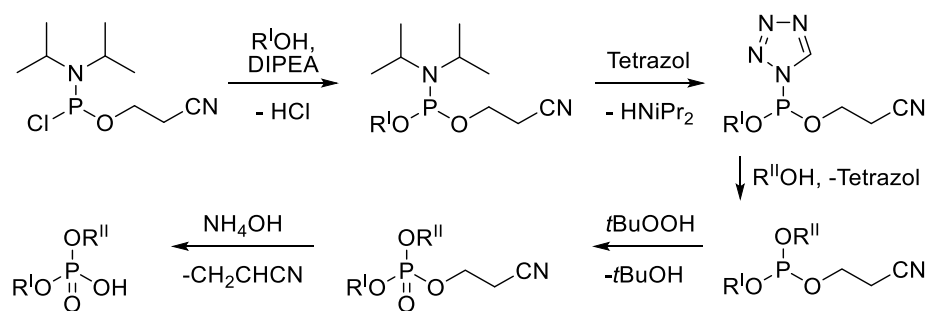


Abb. 1-13 | Allgemeines Syntheschema der Phosphoramidit-Methode mit vorgelagertem Schritt der Amidit-Bildung | Neben Tetrazol (Dicyanoimidazol, Pyridiniumchlorid) können auch andere schwache Säuren zur Aktivierung genutzt und weitere Oxidationsmittel ( $I_2$ , *m*CPBA) verwendet werden. Die abgebildete Cyanoethyl-Schutzgruppe kann durch Eliminierung entfernt werden.  $R^I$  und  $R^{II}$  = beliebige organische Reste.

Die in Abb. 1-13 gezeigte Phosphoramidit-Methode<sup>[92,93]</sup> erfreut sich großer Beliebtheit in der Nukleotidchemie, doch auch zur Synthese von Phospholipiden findet sie Verwendung. Dazu wird ein Alkohol mit einem Chlorphosphoramidit oder einem Phosphordiamidit in ein Phosphoramidit überführt. Dieses bildet anschließend *in situ* durch Reaktion mit einer schwachen Säure (meist Tetrazol) ein aktiviertes Intermediat (Tetrazolid), welches in einer nucleophilen Substitution mit einem zweiten Alkohol zum gewünschten Phosphodiester reagiert. Günstigerweise ermöglicht der Einsatz entsprechender Phosphoramidite die Synthese ungeladener Phosphotriester mit variabler Schutzgruppe (z.B. Bn, Me, *t*Bu, Cyanoethyl), was nachfolgende Syntheseschritte erleichtert, aber zusätzliche Reaktionen zur Entschützung erforderlich macht. Mithilfe einer Phosphoramidit-basierten Strategie gelang beispielsweise GAUDINO *et al.* die Synthese einfach fluoreszent markierter Sphingomyelin-Analoga aus Ceramiden (siehe Kapitel 1-1-4).<sup>[67]</sup>

## 1-5 | Fluoreszenz – Prinzip & Anwendung

Wie bereits in Kapitel 1-1-4 erwähnt, eignen sich insbesondere zerstörungsfreie spektroskopische Methoden zum Studium der Wirkung eines Enzyms auf sein Substrat. Dazu dienen aufgrund ihrer großen Empfindlichkeit und einfachen Anwendung oft Fluoreszenz-basierte Methoden.

### 1-5-1 | Allgemein

Fluoreszenz ist eine Form der Lumineszenz und bezeichnet die Emission von Licht durch ein Molekül oder Atom (den Fluorophor) innerhalb einer kurzen Zeit ( $\sim 10$  ns) nach dessen Anregung.<sup>[64]</sup> Wie im JABŁOŃSKI-Schema (siehe Abb. 1-14) dargestellt, tritt Fluoreszenz auf, wenn der Fluorophor durch Absorption eines Photons in einen angeregten elektronischen Singulettzustand wechselt ( $S_0V_0 \rightarrow S_1V_x$ ), welcher nach kurzer Zeit unter Abgabe eines Photons wieder in den elektronischen Grundzustand übergeht.

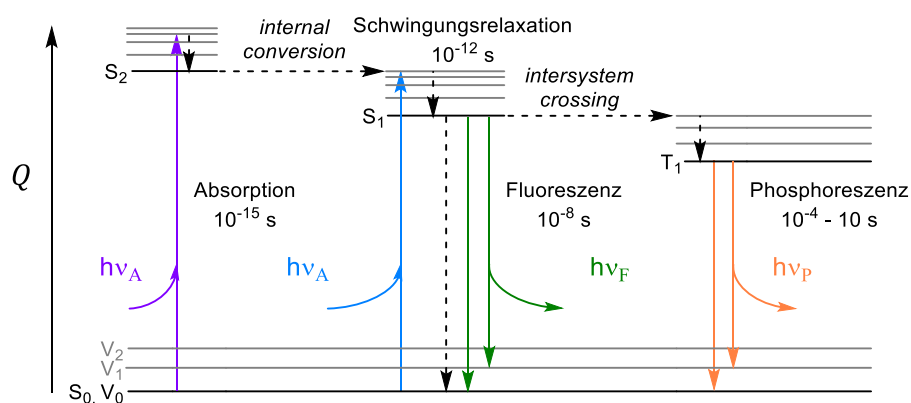


Abb. 1-14 | JABŁOŃSKI-Schema | Durchgezogene Pfeile symbolisieren Prozesse unter Absorption  $\uparrow$  oder Emission  $\downarrow$  von Photonen, deren Energie  $Q$  durch Länge und Farbe der Pfeile angedeutet wird, violett, blau: Absorption, grün: Fluoreszenz und orange: Phosphoreszenz, *internal conversion*: strahlungsloser Übergang zwischen Zuständen gleicher Multiplizität, *intersystem crossing*: (spinverbotener) Übergang zwischen Zuständen verschiedener Multiplizität, modifiziert nach LAKOWICZ,<sup>[64]</sup> Erläuterung im Text.

Das im Fluoreszenzprozess ausgesendete Photon ist in der Regel energieärmer als das eingestrahlte, da beim Wechsel in ein neues Anregungsniveau meist höhere Schwingungszustände ( $S_1V_{x>0}$ ) besetzt werden, die durch rasche Schwingungsrelaxation einen kleinen Teil der eingestrahlichten Energie abgeben, bevor Fluoreszenzemission auftritt ( $S_1V_0 \rightarrow S_0V_x$ ). Diese energetische Differenz wird als STOKES-Verschiebung bezeichnet und ist die Ursache dafür, dass die Wellenlänge der im Fluoreszenzprozess emittierten

Photonen gegenüber den absorbierten Photonen rotverschoben ist. Alternativ kann der angeregte Zustand auch strahlungslos relaxieren oder nach *intersystem crossing* zu langandauernder Phosphoreszenz ( $T_1V_0 \rightarrow S_0V_x$ ) befähigt werden.

Fluoreszenz tritt sowohl in natürlich auftretenden Materialien geologischen ( $\text{CaF}_2$ )<sup>[94]</sup> wie biogenen Ursprungs (Porphyrine, Chinin, grün fluoreszierendes Protein (GFP)), als auch in vielen synthetischen organischen (Fluorescein, Cyaninfarbstoffe, Cumarine) und anorganischen (Quantenpunkte, Lanthanoidkomplexe) Verbindungen auf.<sup>[64]</sup> Anders als die Messung der Lichtschwächung beim Probendurchtritt (Absorption, Transmission), wird das Fluoreszenzlicht idealerweise im Winkel von  $90^\circ$  zur Lichtquelle gemessen, um das emittierte vom eingestrahlten Licht zu separieren. Da das Auftreten von Emission wesentlich empfindlicher als die Lichtschwächung bei Transmission detektiert werden kann, ist Fluoreszenzmessung (Fluorimetrie) eine sehr sensitive Methode. Dazu trägt zusätzlich bei, dass die Fluoreszenzemission aufgrund der STOKES-Verschiebung durch die Verwendung von Filtern vom Anregungslicht unterschieden werden kann. Hinzu kommt, dass zwar die meisten Stoffe ein gewisses elektromagnetisches Spektrum absorbieren, aber bei weitem nicht alle fluoreszieren, wodurch der Untergrund der Messung oft vernachlässigbar klein ist. Speziell Fluorophore mit Anregungswellenlängen im sichtbaren Bereich (Vis), sind deshalb ein unschätzbar nützliches Werkzeug zur Untersuchung von Analyten in komplexen Matrices, etwa Wasserproben, Gewebe oder Zellen. Letztere können etwa fluoreszent eingefärbt werden um unter dem Mikroskop verschiedene Kompartimente sichtbar zu machen. Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine der elementaren Techniken der Lebenswissenschaften und hat durch die Entwicklung eines gewaltigen Methodenarsenals,<sup>[64]</sup> einer großen Auswahl kommerziell erhältlicher Marker für die unterschiedlichsten Zielstrukturen und nicht zuletzt immer ausgefeilterer Anregungstechniken (Konfokales Laserrastermikroskop, Multiphotonenanregung, Superresolution) einen steten Aufwind erfahren. Die Bedeutung dieser Technik wird unterstrichen durch die Verleihung des Chemie-Nobelpreises 2014 an ERIC BETZIG, STEFAN W. HELL und WILLIAM E. MOERNER mit dem ihre Verdienste um die Weiterentwicklung fluoreszenzmikroskopischer Techniken zur Überwindung des ABBE'schen Auflösungslimits gewürdigt werden.<sup>[95]</sup>

### 1-5-2 | Umgebungseinfluss

Verglichen mit einem isolierten Fluorophor in der Gasphase erfährt ein in einem Lösungsmittel gelöster Fluorophor vielfältige Interaktionen, die sein Fluoreszenzverhalten stark beeinflussen. So kann sich die Emissionswellenlänge, die Quantenausbeute oder die Struktur des Spektrums verändern. Es existiert keine umfassende Theorie, die alle Effekte beschreibt.

Unter anderem lassen sich folgende Effekte<sup>[64]</sup> konstatieren:

- 1.) Generelle Effekte (lösungsmittelabhängige STOKES-Verschiebung) aufgrund der Interaktion des Fluorophordipols mit dem Solvens (Permittivität, Brechungsindex)
- 2.) Spezifische Effekte aufgrund der Interaktion des Fluorophors mit dem Solvens (Temperatur, Viskosität, chemische Interaktionen wie Wasserstoffbrücken)
- 3.) Zustände mit verschiedenen Emissionsspektren in Abhängigkeit von der Struktur des Fluorophors und der Interaktion mit dem umgebenden Lösungsmittel ((T)ICT)
- 4.) Fluorophor-Fluorophor-Wechselwirkungen (FRET)

**Zu 1.)** Zur Veranschaulichung der lösungsmittelabhängigen STOKES-Verschiebung kann man sich den Fluorophor als sphärischen Dipol vorstellen der von Dipolen des Lösungsmittels umgeben ist. Letztere orientieren sich um ersteren und senken sein Energieniveau im Vergleich zum isolierten Fluorophor.

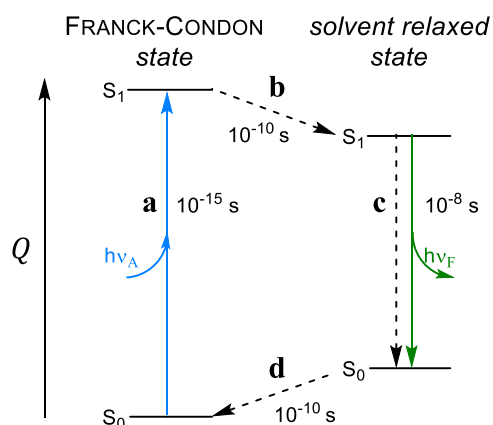


Abb. 1-15 | JABŁOŃSKI-Schema der lösungsmittelabhängigen STOKES-Verschiebung eines Fluorophors in Lösung | Anregung (a), Lösungsmittelrelaxation des angeregten Zustands (b), strahlungslose oder fluoreszente Rückkehr zum elektronischen Grundzustand (c) und Lösungsmittelrelaxation des Grundzustands (d), modifiziert nach LAKOWICZ,<sup>[64]</sup> Erläuterung im Text.

Wie in Abb. 1-15 dargestellt, wird nach Anregung eines Fluorophors (**a**) ein neuer elektronischer Zustand mit verändertem (in der Regel größerem) Dipolmoment erzeugt, um den sich die Elektronen des Lösungsmittels instantan neu arrangieren. Aufgrund der Schnelligkeit des Prozesses treten währenddessen keine Kernbewegungen auf (FRANCK-CONDON-Prinzip).<sup>[64]</sup> Da die Lebensdauer des angeregten Zustands ausreichend lang ist ( $\sim 10$  ns), orientieren sich nun auch die Atomkerne des Lösungsmittels neu, wodurch der angeregte Zustand eine relative energetische Absenkung erfährt (**b**). Unter Aussendung eines Photons (= Fluoreszenzemission) oder strahlungslose Prozesse geht der Fluorophor wieder in den elektronischen Grundzustand über (**c**), der nach Neuorientierung der Kerne des umgebenden Lösungsmittels (**d**) wieder im Ausgangszustand vorliegt. Das Ausmaß der energetischen Stabilisierung (**b** und **d**) führt zu einer Rotverschiebung des Fluoreszenzspektrums und wird durch die LIPPERT-MATAGA-Gleichung (Gl. 1) unter Annahme sphärischer, nicht-polarisierbarer Fluorophore approximiert:<sup>[64]</sup>

$$\Delta\bar{\nu} = \frac{2\Delta f(n, \epsilon_M)}{hcR^3} (\mu_E - \mu_G)^2 + K$$

Gl. 1 | LIPPERT-MATAGA-Gleichung | Die lösungsmittelabhängige STOKES-Verschiebung  $\Delta\bar{\nu}$  in Abhängigkeit vom Dipolmoment  $\mu$  des angeregten (E) oder Grundzustands (G), der Konstante  $K$ , dem Radius  $R$  des Lösungsmittelkäfigs, der Vakuumlichtgeschwindigkeit  $c$ , der Polarisierbarkeit  $\Delta f$  des Mediums als Funktion seines Brechungsindex  $n$  und seiner Permittivität  $\epsilon_M$ , sowie der Planck-Konstante  $h$ , reproduziert nach LAKOWICZ.<sup>[64]</sup>

Besonders ausgeprägt ist der Effekt für Fluorophore mit starkem *intramolecular charge transfer* (ICT). Sie bestehen aus einem System von miteinander konjugiertem Elektronendonator (oft -NHR<sub>2</sub>) und -akzeptor (z.B. -NO<sub>2</sub>), in welchem durch Anregung mit Licht eine Ladungstrennung erfolgt. Aus dem infolgedessen drastisch veränderten Dipolmoment resultiert je nach Polarität der lokalen Umgebung eine unterschiedliche Stabilisierung. Die resultierende charakteristische Rotverschiebung des Emissionsspektrums wird z.B. in *polarity probes* genutzt, mit deren Hilfe die Polarität der unmittelbaren Umgebung des Fluorophors gemessen werden kann. Die durch die LIPPERT-MATAGA-Gleichung erfassten Verschiebungen des Fluoreszenzspektrums basieren nur auf dem Brechungsindex  $n$  und der Permittivität des (isotropen) Mediums  $\epsilon_M$  und treten mithin generell in jeder Lösung eines Fluorophors auf. Sie sind für unpolare Lösungsmittel (Hexan) vernachlässigbar klein und für polarere Lösungsmittel substanziell.

**Zu 2.)** Neben diesen generellen Effekten existieren jedoch noch weitere schwerer erfassbare Einflüsse durch die Interaktion des Fluorophors mit dem Lösungsmittel,



welche oft um Größenordnungen über den generellen Lösungsmittelleffekten liegen. Sie basieren beispielsweise auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken, die geladene Zustände zusätzlich stabilisieren oder auf durch Komplexbildung hervorgerufenen Änderungen der Elektronendichte eines Fluorophors. In diesem Zusammenhang werden Abweichungen vom mittels LIPPERT-MATAGA-Gleichung beschriebenen Verhalten als Hinweis auf besondere Interaktionen interpretiert.

**Zu 3.)** Weitere wichtige Effekte mit Einfluss auf das Fluoreszenzverhalten eines angeregten elektronischen Zustands<sup>[64,96]</sup> sind beispielsweise *Twisted intramolecular charge transfer* (TICT)<sup>[97]</sup> und *Excited state intramolecular proton transfer* (ESIPT). Im Falle von TICT existiert der angeregte Zustand  $S_1$  in zwei Zuständen: dem initial gebildeten planaren *local excited state* (LE) mit partieller Ladungstrennung, welcher adiabatisch in einen zweiten verdrehten TICT-Zustand mit größerer Ladungstrennung übergehen kann. Letzterer zeigt stark rotverschobene Fluoreszenz, da eine ausgeprägte Stabilisierung durch das Lösungsmittel auftritt. Häufig zeigt der TICT-Zustand aber auch strahlungslosen Fluoreszenzabbau (*decay*). Je nach Lösungsmittel ist entweder der LE- oder der TICT-Zustand energetisch niedriger, sodass das Fluoreszenzspektrum dem einer gewichteten Mischung der Spezies entspricht. Die Fähigkeit zur Ausbildung von TICT-Zuständen hängt maßgeblich von der Elektronendonator- bzw. -akzeptorstärke der Substituenten und ihrer durch 1,3-Allyl-Spannung bedingten Rotationsbarriere am meist aromatischen Fluorophor ab. Ähnlich wie in Falle von TICT fluoreszieren bei ESIPT zwei zueinander isomere Molekülspezies. Im Falle von ESIPT sind diese Spezies Tautomere, die durch ein vom Grundzustand  $S_0$  abweichendes Protonenarrangement verschiedene Dipolmomente aufweisen.

**Zu 4.)** Eine weitere Änderung des Fluoreszenzspektrums resultiert aus der Fluoreszenzlöschung (*quenching*) durch Interaktion des Fluorophors mit einem zweiten Atom oder Molekül. Prinzipiell muss zwischen statischer Fluoreszenzlöschung (Anregung verhindert) und dynamischer Fluoreszenzlöschung (Fluoreszenzemission verhindert) unterschieden werden. Dabei bleibt der Fluorophor jedoch definitionsgemäß intakt. Die Mechanismen sind vielfältig und komplex, weshalb an dieser Stelle auf weiterführende Literatur<sup>[64,98]</sup> verwiesen sei. Jedwede Fluoreszenzlöschung erfordert auf molekularer Ebene eine gewisse räumliche Nähe der beteiligten Spezies. Darum erlaubt ihr Studium Rückschlüsse auf die Distanz sowie die Umgebung und die Beweglichkeit des Fluorophors

bzw. des *quencher*s (siehe Kapitel 1-5-4 bis 1-5-7). Bemerkenswert ist die Möglichkeit, die Anregungsenergie eines Fluorophors durch Interaktion mit einem zweiten Atom oder Molekül auf diesen sogenannten Akzeptor zu übertragen. Der Akzeptor kann infolgedessen seinerseits zu Emission befähigt werden (FRET, siehe Kapitel 1-5-6).<sup>[64,98]</sup>

### 1-5-3 | Photoreaktionen

Zusätzliche Änderungen des Fluoreszenzspektrums bewirken Photoreaktionen, die jedoch von den erläuterten Umgebungseinflüssen und besonders dem *quenching* streng abzugrenzen sind. Elektronisch angeregte Zustände sind nicht nur zur Emission befähigt, sondern können auch reaktive Spezies erzeugen, die eine chemische Reaktion eingehen (z.B. Umlagerungen oder NORRISH-Reaktionen).<sup>[99,100]</sup> Im Gegensatz zum *quenching* bleibt das Fluorophor dabei nicht erhalten. Die Fluoreszenzintensität kann durch photochemische Reaktionen verringert werden oder gänzlich neue Chromophore erzeugt werden. Im Experiment macht sich dies besonders bei hoher Belichtungsstärke als Ausbleichen (*bleaching*) des Fluorophors bemerkbar. Zwar stört *bleaching* oft, weil es die maximale Beobachtungsdauer begrenzt, es kann jedoch auch nutzbar gemacht werden. So kann mittels FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) etwa aus der Geschwindigkeit mit der sich die Fluoreszenz zuvor gebleichter Areale einer Membran durch lateralen Transport erholt, auf die Diffusionsgeschwindigkeit des Analyten geschlossen werden.<sup>[101,102]</sup> Daneben ist das selektive *bleaching* des Donors oder des Akzeptors in der Mikroskopie eine beliebte Methode zur Bestimmung der FRET-Effizienz nach Gl. 3 (siehe Kapitel 1-5-6).<sup>[98]</sup> Eine gezielte Spaltung eines Moleküls mithilfe einer durch Absorption eines Photons initiierten chemischen Reaktion wird zum *photouncaging* genutzt, mit dessen Hilfe maskierte Moleküle örtlich und zeitlich definiert freigesetzt und so ihre lokalen Effekte studiert werden können.

### 1-5-4 | Ausgewählte Fluorophore

Es existieren eine Reihe natürlicher Fluorophore<sup>[64]</sup> (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, NAD(P)H, FAD, Chlorophyll a, grün-fluoreszierendes Protein (GFP)), die eine *label*-freie direkte Fluoreszenzspektroskopie von Biomolekülen erlauben. Um die Methode breiter anwenden zu können und günstigere Fluoreszenzeigenschaften zu erzielen (Quantenausbeute, Anregungs- und Emissionswellenlänge *etc.*), wurden diverse synthetische Fluorophore entwickelt, sodass heute eine große Zahl an Reagenzien zur Verfügung steht,

um etwa Proteine, Nanopartikel, oder Lipide zu markieren (*labeling, tagging*). Es ist für die jeweilige Anwendung von großer Wichtigkeit, aus der Vielzahl der verfügbaren Fluorophore ein mit Rücksicht auf die jeweiligen spektroskopischen Parameter, Anknüpfung und Biokompatibilität passendes Fluorophor auszuwählen.<sup>[5]</sup> Einige im Rahmen dieser Arbeit genutzte Vertreter werden im folgenden Abschnitt kurz vorgestellt.

### Nitrobenzoxadiazole

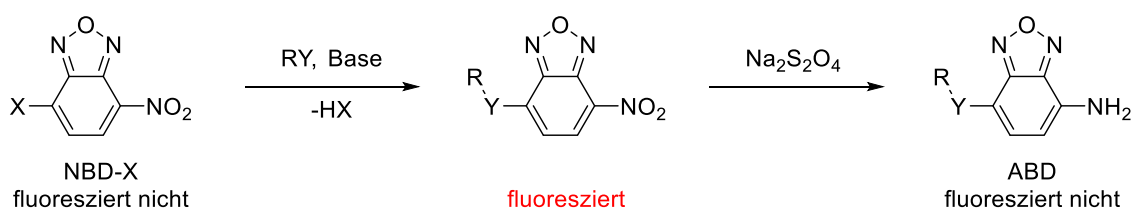


Abb. 1-16 | Fluoreszenzmarkierung durch 4-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-benzoxadiazole und chemische Zerstörung des Fluorophors durch Reduktion mit Dithionit | X = F, Cl; Y = O, S, NH, NR.

Das Reagenz 7-Chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-benzoxadiazol (NBDCl) wurde 1968 von GHOSH und WHITEHOUSE auf der Suche nach antileukämischen Wirkstoffen entdeckt.<sup>[103]</sup> Es zeigte sich schnell, dass es mit primären Aminen bereitwillig unter Bildung intensiv fluoreszierender Verbindungen reagiert, die im Gegensatz zum alternativ geeigneten Reagenz 5-(Dimethylamino)naphthalen-1-sulfonylchlorid (Dansylchlorid) zur Detektion kein UV-Fluorimeter erfordern. Zum Zwecke der Fluoreszenzmarkierung wird nahezu ausschließlich 7-Chloro- oder das reaktivere 7-Fluoro-4-nitro-1,3,2-benzoxadiazol mit Aminen und Thiolen in einer nucleophilen aromatischen Substitutionsreaktion umgesetzt (Abb. 1-16). Auch mit Alkoholen ist diese Reaktion möglich, jedoch lassen sich so eingeführte Alkoxysubstituenten ihrerseits mit Thiolen oder Aminen substituieren, was auch Anwendung zum *affinity labeling* von Aminen findet.<sup>[104]</sup> Das erzeugte elektronenarme aromatische System zeigt mit Y = NH eine starke Fluoreszenz (Ex/Em 480/550) und mit Y = S eine schwache Fluoreszenz (Ex/Em 430/530), die bei den Alkoxy-substituierten Derivaten noch schwächer ist und bei den Halogenverbindungen völlig fehlt. Grundlage dieses Verhaltens ist die mehr oder weniger ausgeprägte Ausbildung eines *charge-transfer*-Komplexes, der je nach N-Substitution auch zu einem TICT-Komplex (siehe Kapitel 1-5-2) relaxieren kann.<sup>[105]</sup>

Aufgrund der relativ einfachen Einführung in Biomoleküle über ubiquitäre primäre Amine (Aminosäuren, Lysin in Proteinen, Lipide, Aminoglycoside *etc.*) und der Anregbarkeit mit

gängigen Lichtquellen (488 nm) erfreut sich das NBD-Label einiger Beliebtheit zur Detektion für HPLC, DC und SEC, sowie Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie.<sup>[101]</sup> Die günstigen Eigenschaften und Anwendungsbeispiele sind in Übersichtsartikeln eingehend dokumentiert.<sup>[101,106]</sup> Hervorzuheben ist, dass die Fluoreszenz des NBD-Fluorophors in großem Maße von der Polarität der Umgebung abhängt; in unpolarer Umgebung ist die Fluoreszenz intensiv und langlebig (7-10 ns) in polarer Umgebung schwach und durch die Interaktion mit Wasserstoffbrückendonoren kurzlebig (0.9 ns).<sup>[107]</sup> Dies macht NBD zu einer wertvollen Sonde für die Polarität, den Wassergehalt und die Struktur der direkten molekularen Umgebung, weswegen es vielfach zum Studium von mizellaren Systemen und Lipidmembranen genutzt wird (*sphere-to-rod-transition*, Lipidtransport, -aggregation und -metabolismus).<sup>[106,108,109]</sup> Beispielhaft seien hier Arbeiten der Gruppe um NICOLAU erwähnt, in denen NBD-PtdE zum Nachweis der pH-abhängigen Lysozym-vermittelten Fusion von Liposomen und Nucleus-Membranen verwendet wurde.<sup>[110]</sup> NBD-markierte Lipide finden ebenfalls häufig Anwendung in der Analyse der Beweglichkeit von Lipiden. Eine gut etablierte Methode dazu ist *fluorescence recovery after bleaching* (FRAP)<sup>[101,102]</sup> mit deren Hilfe etwa die Fluidität der Umgebung und die Mobilität eines fluoreszierenden Analyten in einer Lipidschicht bestimmt werden, indem durch intensive Belichtung definierte Bereiche ausgebleicht werden und der zeitliche Verlauf ihrer Repopulation mit fluoreszierenden Spezies beobachtet wird. Eine wertvolle Erweiterung des Anwendungsbereichs NBD-markierter Lipide stellt auch die Dithionit-Methode<sup>[111]</sup> dar. Fälschlicherweise oft als *dithionite-quenching* bezeichnet, bewirkt die Reaktion des NBD-Fluorophors mit dem gelösten Dithionit-Ion  $S_2O_4^{2-}$ , eine irreversible Reduktion des Nitroaromaten NBD zum nicht-fluoreszierenden Anilin-Derivat ABD (Abb. 1-16 rechts). Da das Reduktionsmittel aber nur in Wasser löslich ist, überwindet es Lipidmembranen nicht und reduziert folglich nur die Fraktion des NBD-haltigen Lipids, welche auf der ihm zugewandten Seite der Doppelschicht liegt. Damit ist eine Bestimmung der Asymmetrie der Lipidverteilung möglich, was auch zum Studium des sog. *flip-flop*, also der Translokation eines Lipids von einer auf die gegenüberliegende Seite der Doppelschicht genutzt wird.<sup>[112]</sup> Auch intermolekulare Nitroxid-vermittelte Fluoreszenzlöschung und FRET von NBD-markierten Lipiden lieferten wertvolle Einblicke in die Struktur biologischer Membranen. Eine weitere Anwendung sind Untersuchungen zum Stoffwechsel NBD-markierter (Sphingo)lipide, deren Werdegang durch Lokalisation und Reisolation fluoreszierender Metabolite nachverfolgt werden kann. Aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten ist

eine Reihe NBD-markierter Lipide kommerziell verfügbar (Phosphatidylethanolamin (PtdE), Phosphatidylserin (PtdS), Cholesterol, Sphingomyelin (SM), Sphingosin, Sphinganine, Ceramid (Cer)). Sphingolipide sind dabei aufgrund der einfacheren Synthese und zur Verhinderung unerwünschter Effekte (Interaktion, Löschung) bei Markierung der Kopfgruppe meist im unpolaren Lipidschwanz modifiziert. Kritisch anzumerken ist, dass in biologische Membranen eingebettete Lipide, deren hydrophobe Schwanzregion mit NBD markiert ist, nur bedingt die natürliche Situation wiedergeben da sie aufgrund der hohen Polarität des *labels* zu einem *looping-back* an die Membranoberfläche neigen.<sup>[113,114]</sup> Neben Fluoreszenz-basierten Techniken wurde dieser Effekt auch mit NMR-spektroskopischen Methoden an NBD-markierten PtdC-Analoga nachgewiesen. Dabei zeigen verschieden lange Homologe gleichermaßen eine dynamische Orientierung von NBD vorzugsweise im Bereich zwischen carboxylgruppennahen Methylengruppen und Glycerolteil.<sup>[114]</sup> Die Autoren vermuten als Ursache COULOMB- und Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen NBD und der polaren Kopfgruppe. Sie konstatieren, dass NBD aufgrund seines bevorzugten Aufenthalts an der Lipid-Wasser-Grenzfläche besonders zum Studium von Phänomenen in dieser Region geeignet ist.

## Phenoxazine

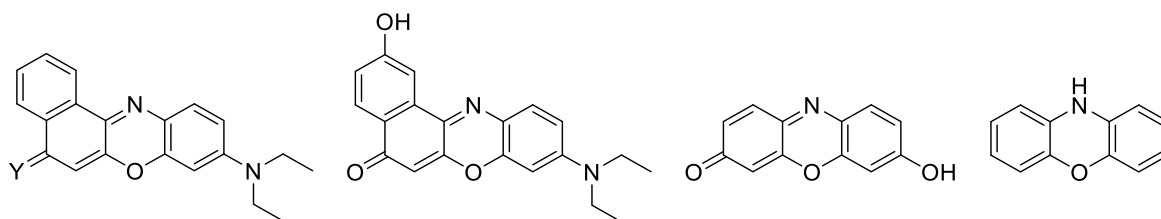


Abb. 1-17 | Strukturen ausgewählter Phenoxazinfarbstoffe | von links nach rechts: Nilrot (Y = O) bzw. Nilblau (Y = NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 2-Hydroxy-Nilrot, Resorufin und der Phenoxazin-Grundkörper.

Nilrot (NR, 9-Diethylamino-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-5-on, Abb. 1-17) ist ein Phenoxazin-basierter Fluoreszenzfarbstoff, der sich den Grundkörper mit den natürlich vorkommenden und für ihre Farbigkeit bekannten Verbindungen Lackmus und Orcein teilt. Ferner finden sich Phenoxazin-Motive auch in synthetischen und natürlichen Wirkstoffen mit antibiotischer (Actinomycine)<sup>[115]</sup> oder antihyperlipidämischer Wirkung (Ragaglitazar<sup>™</sup>) und fluorogenen Enzymsubstraten (Resorufin, Abb. 1-17).<sup>[66]</sup> Neben ihrer ausgeprägten

Farbigkeit zeigen sie pH-Responsivität und ausgeprägte Solvatochromie<sup>e</sup>,<sup>[5]</sup> weswegen sie vielfach als pH-Indikatoren (Lackmus) oder Sonden für die lokale Polarität (Nilrot, Nilblau) Verwendung finden. Nilrot und das verwandte Nilblau reichern sich in hydrophoben Bereichen einer Zelle an und dienen in der Histologie vielfach der Färbung und Unterscheidung von Lipiden. Dabei zeigt Nilrot unter dem Lichtmikroskop in unpolarer Umgebung eine gelbliche Farbe die mit Erhöhung der Polarität der Umgebung langsam in dunkles Violett wechselt. Zudem ist das protonierte Nilrot dunkelblau. Aus den optischen Eigenschaften des eingelagerten Farbstoffes kann so auf dessen Umgebung geschlossen werden. Daneben wird auch die ausgeprägte Fluoreszenz von Nilrot zur Markierung von Molekülen, besonders Lipiden, verwendet. Um eine kovalente Anbindung des Nilrot-Fluorophors zu erzielen, kann sein 2-Hydroxy-Derivat (Abb. 1-17) verwendet werden, das durch thermische Kondensation von *o*-Nitrosophenolen mit Naphtholen erhalten werden kann.<sup>[117]</sup> Dieses Derivat kann durch Alkylierung der phenolischen Gruppe<sup>[117-119]</sup> leicht in größere Moleküle inkorporiert werden. Nilrot zeigt ICT (*intramolecular charge transfer*, siehe Kapitel 1-5-2) was sich in der Breite und Lage der Fluoreszenzbande niederschlägt.<sup>[120]</sup> Phenoxazine und Nilrot im Speziellen sind nur mäßig photostabil, was ihre Anwendung unter Dauerbelichtung einschränkt.

## Cumarine

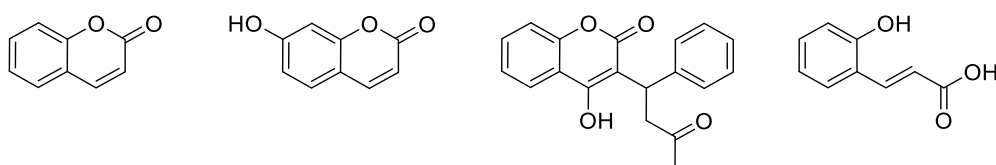


Abb. 1-18 | Strukturen ausgewählter Cumarine | von links nach rechts: Cumarin, Umbelliferon und Warfarin, sowie 2-Hydroxyzimtsäure, von der sich die Cumarine ableiten.

Cumarine (2H-1-Benzopyran-2-one oder Chromen-2-one) sind natürlich vorkommende und synthetische Verbindungen die sich vom Lacton der 2-Hydroxyzimtsäure ableiten. Vertreter dieser vielfältigen Stoffklasse dienen als Aromastoffe (Cumarin in Tonkabohne,

<sup>e</sup> Solvatochromie bezeichnet die Veränderung der Lichtabsorption eines gelösten Chromophors in Abhängigkeit vom Lösungsmittel<sup>[116]</sup> (nicht zu verwechseln mit lösungsmittelabhängiger STOKES-Verschiebung, Kapitel 1-5-2 ). Dabei führt die Wechselwirkung des Mediums mit dem elektronischen Grundzustand zur Änderung des Energieniveaus desselben, woraus eine Verschiebung der Wellenlänge des Absorptionsmaximums resultiert, die sich in einer Farbveränderung äußert. Negative S. erhöht die erforderliche Energie und führt zu einer hypsochromen Verschiebung (=Absorption kürzerer Wellenlängen), positive S. führt zu einer bathochromen Verschiebung.

Zimt, Waldmeister), Pharmaka (Warfarin), Schädlingsbekämpfungsmittel (Warfarin, Coumachlor) oder Farbstoffe (Umbelliferon) (siehe Abb. 1-18).<sup>[121]</sup> Vom Cumarin abgeleitete Fluoreszenzfarbstoffe zeichnen sich durch eine blaue bis grüne Fluoreszenz mit hoher Photostabilität und hohen Quantenausbeuten aus. Umbelliferon etwa wird als Fluoreszenzindikator, optischer Aufheller, Sonnenschutzmittel und vielfach als fluorophore Gruppe zur Markierung von (Bio-)Molekülen eingesetzt. Die Anregung erfolgt je nach Substitutionsmuster bei Wellenlängen zwischen 300-500 nm, die STOKES'sche Verschiebung ist ausreichend groß, um die Überlappung zwischen Absorptions- und Emissionsspektren zu minimieren.<sup>[5]</sup> Cumarine sind synthetisch leicht zugänglich durch Kondensation von Phenolen mit  $\beta$ -Ketoestern (PECHMANN-Kondensation<sup>[122]</sup>). Durch Variation der Reaktionspartner und nachfolgende Funktionalisierung kann eine Vielzahl unterschiedlicher Substitutionsmuster realisiert werden. So ist eine Feinabstimmung der optischen Eigenschaften durch Derivatisierung möglich (bathochrome Verschiebung, Zweiphotonenwirkungsquerschnitt). Zur kovalenten Anbindung an Zielmoleküle eignen sich Carbonsäure-, Hydroxy-, Hydroxymethyl- und Amino substituierte Derivate von denen eine große Palette kommerziell erhältlich ist. Die gängigsten Cumarine zur kovalenten Fluoreszenzmarkierung sind 7-Hydroxy-Cumarine und 7-Aminocumarine (z.B. 7-Diethylaminocumarin-3-carbonsäure, DEAC), deren ausgeprägter *push-pull*-Charakter in Verbindung mit ICT die Fluoreszenzeigenschaften bestimmt. Je nach Einsatzzweck gilt es aber zu beachten, dass Amino- und Hydroxy-Substituenten häufig eine pH-Responsivität vermitteln, wohingegen die Fluoreszenz von Alkyl-, Alkoxy- und Halogen-substituierten Cumarinen weniger umgebungsempfindlich ist. Die Einführung von Halogensubstituenten kann den Zweiphotonenwirkungsquerschnitt erhöhen.<sup>[123]</sup> Dies machte sich etwa die Arbeitsgruppe TSIEN bei der Entwicklung der 6-Brom-7-hydroxycumarin-4-ylmethoxycarbonyl-Gruppe (BHC)<sup>[124]</sup> zum *two-photon-uncaging* zunutze. Ferner existieren fluorimetrische Methoden zur Bestimmung von Glucosidase- oder Phosphatase-Aktivitäten,<sup>[65]</sup> in denen fluoreszierendes Umbelliferon durch enzymatische Hydrolyse aus nicht-fluoreszierenden Substraten freigesetzt wird.

### 1-5-5 | Fluoreszenzsonden

Die Bestimmung von Analyten in komplexen Matrices auf Basis von Fluoreszenzdetektion ist Gegenstand zahlreicher Publikationen. Verschiedene grundlegende Effekte (PET, PCT, TICT, ESIPT, FRET),<sup>[96,125]</sup> die das Fluoreszenzverhalten eines Moleküls beeinflussen,

können dazu genutzt werden, die Interaktion mit einem Analyten nachzuweisen (siehe Kapitel 1-5-2 und 1-5-6). Dabei bewirkt ein Ereignis (Analytkontakt, Reaktion) eine Veränderung der Fluoreszenzemissionsparameter (Maximum, Intensität, Lebensdauer). Die sprachliche Abgrenzung (Einteilung nach <sup>[126]</sup>) zwischen

- 1.) indifferenten Reportern (auch *tracker*, *tracer* oder *stains*),
- 2.) reversiblen Sensoren/Indikatoren und
- 3.) irreversiblen Sonden

wird häufig nicht ausreichend beachtet. Zu den Reportern, deren Fluoreszenz in erster Linie unabhängig von Analytmolekülen ist und die hauptsächlich strukturelle Informationen liefern, gehören z.B. *lysotracker*. Dies sind fluoreszierende membranpermeable Moleküle die durch Protonierung einer geeigneten funktionellen Gruppe membranimpermeabel gemacht und so angereichert werden. Sie erlauben darum die Fluoreszenz-Anfärbung saurer Zellkompartimente (z.B. Lysosomen) und erfreuen sich großer Beliebtheit zur Kollokalisierung in der Fluoreszenzmikroskopie.

Im Unterschied dazu gibt es auch fluoreszierende pH-Sensoren/Indikatoren, deren Fluoreszenzeigenschaften sich durch eine Protonierung drastisch ändern. Sie liefern dadurch Informationen über den pH-Wert. Sie werden nicht nur zur titrimetrischen pH-Wertbestimmung, sondern vor allem zur nicht-invasiven fluoreszenzmikroskopischen Messung lokaler pH-Werte eingesetzt.

Ein Meilenstein der mikroskopischen Bildgebung war die Einführung des ersten Sensors für intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ , welcher die zerstörungsfreie Detektion dieses wichtigen Botenstoffs in lebenden Zellen ermöglichte.<sup>[127]</sup> Die eigentlich polyanionischen fluoreszierenden Calcium-Chelatoren wurden dazu durch Acetoxymethylierung membranpermeabel gemacht und im Zytosol durch ubiquitäre Esterasen wieder freigesetzt. Weiterführende Arbeiten<sup>[128]</sup> verbesserten die spektroskopischen Eigenschaften und die Selektivität gegenüber anderen Ionen und führten ratiometrische Methoden ein. Letztere erlauben die Berechnung der Analytkonzentration aus dem Verhältnis von zwei Messwellenlängen ohne die Kenntnis der lokalen Sensor-Konzentration, was die Anwendung in nicht-homogenen Matrices erst ermöglichte. Auf diesem Prinzip basierend wurden seitdem viele weitere Sensoren für biologisch relevante Metallionen ( $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{1+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  etc.) entwickelt.<sup>[129]</sup>



Eine deutlich abzugrenzende Methode zum *bioimaging* kleiner Moleküle stellen Fluoreszenzsonden dar. Das von ihnen detektierte Ereignis ist irreversibel und bewirkt eine einmalige Änderung der Fluoreszenzeigenschaften, d.h. dass die spätere Entfernung des detektierten Analyten das Signal nicht wieder zurück in den Ausgangszustand versetzt. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn ein FRET-Paar durch einen Analyten irreversibel getrennt oder einer der beiden Partner chemisch modifiziert wird (siehe Beispiele im Abschnitt 1-5-6). Im Falle von Fluoreszenzsonden bleibt häufig nach abgeschlossener Reaktion ein weiterhin fluoreszierendes Molekül zurück, welches einen Reporter darstellt. Dies gilt etwa für *activity-based probes* (ABPs), die Enzyme kovalent markieren oder *memory probes*, die ein über die Zeit akkumulierendes Reaktionsprodukt liefern. Die über den Nachweis kleiner Moleküle hinausgehende Detektion von Biomolekülen (Botenstoffe, Enzyme) mit Hilfe von FRET-Sonden ist Gegenstand aktueller Forschung. Dabei treten besonders Probleme bezüglich der Selektivität, der Aktivität und des *delivery* in der komplexen zellulären Umgebung auf.

### 1-5-6 | FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET)

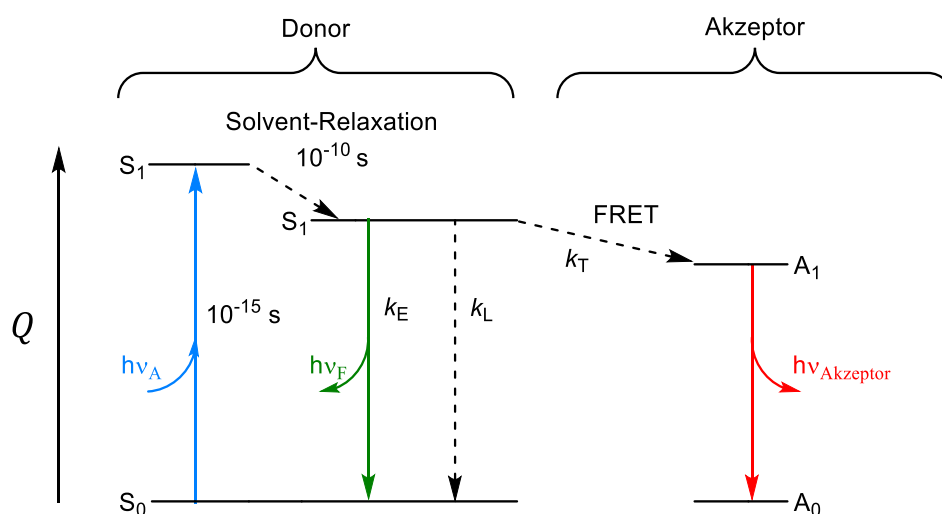


Abb. 1-19 | JABLONSKI-Schema des FÖRSTER-Resonanzenergietransfers (FRET)<sup>[64]</sup> | Durchgezogene Pfeile symbolisieren die Absorption  $\uparrow$  oder Emission  $\downarrow$  von Photonen, deren Energie  $Q$  durch Länge und Farbe der Pfeile angedeutet wird. blau: Absorption, grün: Fluoreszenz und rot: Emission des FRET-Akzeptors,  $k_E$ ,  $k_L$  bzw.  $k_T$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Emission bzw. der Löschung des FRET-Donors bzw. des FRET zum Akzeptor.

FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET)<sup>[130,131]</sup> ist ein Mechanismus des *quenching*. Er wurde im Jahre 1948 von T. FÖRSTER<sup>[130]</sup> umfassend charakterisiert und hat seitdem vielfältige Anwendung gefunden.<sup>[98]</sup> FRET beschreibt den strahlungslosen Übertrag von zuvor absorbierter Strahlung eines Fluorophors (des Donors) auf einen geeigneten

zweiten Fluorophor (den Akzeptor) durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung. Der Akzeptor wird dadurch seinerseits angeregt und relaxiert in der Folge entweder strahlungslos (*dark quencher*) oder unter Emission eines Photons. Dabei wird eine große STOKES-Verschiebung zwischen initialer Anregung und finaler Emission beobachtet. Die Fluoreszenzlebensdauer des angeregten Donors und der Polarisierungsgrad des eingestrahlten Lichts werden dabei charakteristisch verringert. Das Verhältnis der Rate des FRET-Prozesses  $k_T$  zur Summe der Geschwindigkeitskonstanten aller möglichen existierenden Abbaupfade der elektronischen Anregung des Donors ( $k_E$  = Emissionsrate des Donors,  $k_L$  = Löschung des Donors) wird als FRET-Effizienz  $E$  bezeichnet (siehe Gl. 2).

Gl. 2 | 
$$E = \frac{k_T}{k_T + k_E + k_L}$$

Für ein gegebenes FRET-Paar kann  $E$  durch die Messung der Fluoreszenzintensitäten des Donors in Anwesenheit ( $I_{DA}$ ) und Abwesenheit des Akzeptors ( $I_D$ ) oder der entsprechenden Fluoreszenzlebensdauern ( $\tau_{DA}$  und  $\tau_D$ ) bestimmt werden.<sup>[64]</sup>

Gl. 3 | 
$$E = 1 - \frac{I_{DA}}{I_D} \text{ oder } E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

Die Effizienz  $E$  des Transfers wird maßgeblich vom Abstand  $r$  zwischen Donor und Akzeptor beeinflusst, wobei der sog. FÖRSTER-Radius  $R_0$  der charakteristische Abstand ist, bei dem eine Kombination zweier Fluorophore 50% FRET-Effizienz zeigt.<sup>[64]</sup>

Gl. 4 | 
$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 - r^6}$$

$R_0^6$  hängt seinerseits von der Quantenausbeute des Donors  $\Phi_D$ , vom lokalen Brechungsindex  $n$  sowie von der relativen Orientierung  $\kappa^2$  der Dipolmomente der Donoremission und der Akzeptorabsorption ab ( $\kappa^2 = 0$  für  $\perp$ , 4 für  $\parallel$ ,  $\frac{2}{3}$  für frei rotierende Fluorophore).

Gl. 5 | 
$$R_0^6 = \frac{9000 (\ln 10) \kappa^2 \Phi_D}{128 \pi^5 n^4 N_A} J(\lambda)$$

Das Integral  $J(\lambda)$  bezeichnet das Ausmaß der spektralen Überlappung der normierten Emission des Donors  $F_D^N(\lambda)$  und des Extinktionskoeffizienten des Akzeptors  $\varepsilon_A(\lambda)$ .<sup>[64]</sup>

Gl. 6 | 
$$J(\lambda) = \int_0^\infty F_D^N(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda$$

Die ausgeprägte Abstandsabhängigkeit der FRET-Effizienz (Gl. 4) dient häufig dazu, mittels spektroskopischer Techniken wie mit einem Lineal Inter-Fluorophor-Abstände in der Größenordnung des FÖRSTER-Radius  $R_0$  zu messen, was in der Umschreibung *spectroscopic ruler* seinen Ausdruck findet.<sup>[132]</sup> Da  $R_0$  meist bei 1-10 nm liegt, eignet sich FRET hervorragend zum Studium biologischer Objekte, etwa Proteinen und Lipidmembranen, die in der selben Größenordnung liegen. Da zur Berechnung exakter Fluorophor-Abstände fundamentale Parameter wie der lokale Brechungsindex und die lokale Quantenausbeute für D- und DA-Konstrukt benötigt werden, beschränkt man sich häufig darauf, FRET als *proximity indicator* zu verwenden, der nur relative Veränderungen widerspiegelt.<sup>[64]</sup> Die obigen Gleichungen legen nahe, dass eine jede Kombination zweier Fluorophore FRET zeigt, die eine gewisse spektrale Überlappung, einen Abstand um  $R_0$  und nicht starr-orthogonale Orientierung der Dipole aufweist. Mithin kann aus der breiten Palette von biogenen und synthetischen Fluorophoren geschöpft werden, um molekulare Werkzeuge auf Basis des FRET-Prozesses maßzuschneidern. Aufgrund dieses gezielten Designs und der generell guten Eignung von Fluoreszenztechniken zur Analyse von Reaktionen in komplexen Matrices finden FRET-basierte Methoden zahlreiche Anwendung zur Bestimmung der räumlichen Nähe zwischen (Bio-)Molekülen *in cellulo*.<sup>[131]</sup> Einen großen Schub erfuhr die Methode auch durch den Einsatz fluoreszierender Proteine (FPs) anstelle synthetischer Fluorophore. Diese können mithilfe molekularbiologischer Techniken mit beliebigen Zielproteinen fusioniert werden. Diese Technik erleichtert die gezielte Markierung von Proteinen direkt am Entstehungsort und wurde aufgrund ihrer Nützlichkeit im Jahre 2008 mit dem Nobelpreis an OSAMU SHIMOMURA, MARTIN CHALFIE und ROGER Y. TSIEN<sup>[133]</sup> gewürdigt. Die so gewonnenen Fusionsproteine erlauben die fluoreszenzspektroskopische Untersuchung von Protein-Protein- oder Protein-Ligand-Interaktionen. Die Methode, die benötigten Sonden in der Zelle exprimieren zu lassen, bietet große Vorteile (z.B. bezüglich des *delivery*) und erfreut sich darum großer Beliebtheit, was aber nicht darüber hinwegtäuschen darf, dass sie auf Proteine beschränkt ist. Aufgrund der fassförmigen räumlichen Struktur der FPs sind zudem die Inter-Fluorophor-Abstände verhältnismäßig groß, die Rotationsfreiheit eingeschränkt und die Empfindlichkeit der Messung deshalb gering, was sich in niedrigen *ratio changes* ( $RC$ , Gl. 7) niederschlägt. Diese sind ein probates Mittel zum Vergleich von FRET-Systemen. Je größer dieser Wert, desto empfindlicher kann eine Änderung des FRET detektiert werden.  $RC$  sei hier definiert als das Verhältnis der relativen Intensitäten  $I$  der Fluoreszenz des Donors  $D$

und des Akzeptors *A* nach einem betrachteten Ereignis im Vergleich zum Startwert wie ausgedrückt in Gl. 7.

Gl. 7 | 
$$RC = \frac{I_D^{Ende} \cdot I_A^{Beginn}}{I_A^{Ende} \cdot I_D^{Beginn}}$$

*Ratio changes* liegen für FPs meist bei 1.1 bis maximal 6, für kleinere Fluorophore dagegen um bis zu zwei Größenordnungen darüber.<sup>[134,135]</sup> Auch ohne genaue Kenntnis der Sondenkonzentration erlauben *RC* im Idealfall eine Quantifizierung des FRET-Prozesses, was besonders in der Fluoreszenzmikroskopie wichtig ist.<sup>[64]</sup> So gelingt es beispielsweise, mittels FRET-Techniken Konformationsänderungen eines Östrogenrezeptors zu messen. Dieser ist mit zwei FP-Mutanten markiert, deren Abstand sich bei Ligandbindung am Rezeptor stark verändert. Durch die resultierende Veränderung der FRET-Effizienz kann der Prozess direkt verfolgt werden.<sup>[136]</sup> In ähnlicher Weise dient in einer Publikation der Arbeitsgruppe um MERKX ein genetisch codierter FRET-Sensor zur Bestimmung zytosolischer  $Zn^{2+}$ -Konzentrationen.<sup>[137]</sup> Durch Komplexbildung werden Donor und Akzeptor getrennt und der FRET unterbunden, woraus ein *RC* von maximal 2.4 resultiert.

In Ergänzung zu den geschilderten Methoden erlaubt die chemische Synthese die Darstellung komplett artifizieller FRET-Sonden und ist nicht auf die Markierung von Proteinen beschränkt. Überdies ist eine deutlich flexiblere Gestaltung möglich, etwa mit Hinblick auf die Fluorophore, sowie deren Abstand und Orientierung. Zusätzlich können löslichkeitsvermittelnde Reste, Einheiten zur Zielmolekülbindung oder Organell-dirigierende funktionelle Gruppen angefügt werden. Dieses Vorgehen bietet den Vorzug größtmöglicher Variationsbreite die nur von der erforderlichen Synthesearbeit begrenzt wird.<sup>[5,138]</sup> Dies ist der Grund, warum eine Reihe strukturell einfacher, modular aufgebauter FRET-Sensoren für anorganische Ionen ( $Hg^{2+}$ ,  $H_2S$ ,  $HSO_3^-$ )<sup>[139–141]</sup> existiert, aber nur wenige komplexere Konstrukte. Ein Beispiel für eine solche synthetische FRET-Sonde mit *memory*-Effekt ist die von der Gruppe um XI publizierte Sonde zur stöchiometrischen Bestimmung der intralysosomalen  $H_2S$ -Konzentration.<sup>[140]</sup> Sie besteht aus drei Modulen, die jeweils bestimmte gewünschte Eigenschaften in die Sonde einbringen. Zum einen gibt es einen NBD-haltigen FRET-Akzeptor, der mit  $H_2S$  in einer irreversiblen Thiolyse-Reaktion ein nicht fluoreszierendes Reaktionsprodukt freisetzt. Zum anderen ist in einem minimal kurzen Abstand ein Cumarin-Derivat als FRET-Donor installiert, welches zusätzlich einen Morpholin-haltigen Substituenten trägt, der eine Anreicherung in sauren

Zellkompartimenten nach dem Prinzip der *lysotracker* bewirkt. Nach  $\text{H}_2\text{S}$ -Exposition der Sonde wird der Akzeptor irreversibel entfernt und so der FRET effektiv unterbunden. Der FRET-Donor bleibt als Reporter zurück, der sich im Lysosom anreichert (siehe Abb. 1-20). Ebenso sind vergleichbare Sonden mit 2PE-Anregung zur Detektion von Sulfiten in der Literatur beschrieben.<sup>[141]</sup>

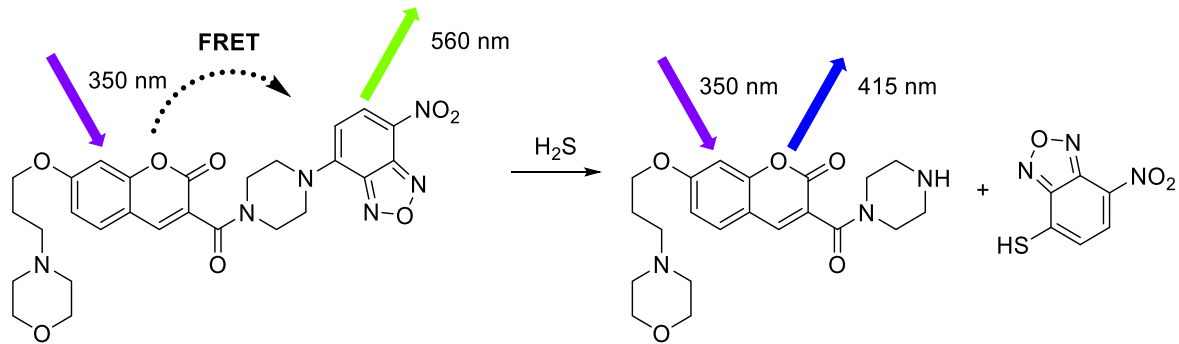


Abb. 1-20 | Prinzip einer FRET-basierten Sulfid-Sonde<sup>[140]</sup> | Ein zu diesem Zwecke eingeführter Morpholin-Substituent bewirkt eine Anreicherung im Lysosom.

Ein dritter Ansatz vereint Elemente des ersten und des zweiten Ansatzes in der chemischen Synthese eines FRET-aktiven Enzymsubstrats. Werden die Fluorophore durch die Aktivität des Enzyms voneinander getrennt, lässt sich das Ausmaß dieser Reaktion anhand der Änderung  $I_{\text{FRET}}/I_{\text{Donor}}$  bestimmen. Wegweisende Arbeiten dazu erfolgten im Jahre 1998 in der Arbeitsgruppe TSIEN.<sup>[134]</sup> Dort konnte  $\beta$ -Lactamase-Aktivität in lebenden Zellen durch die Modulation des FRET eines Chlorocumarin/Fluorescein-markierten Cephalosporins ( $RC \sim 70$ ) nachgewiesen werden (siehe Abb. 1-21).

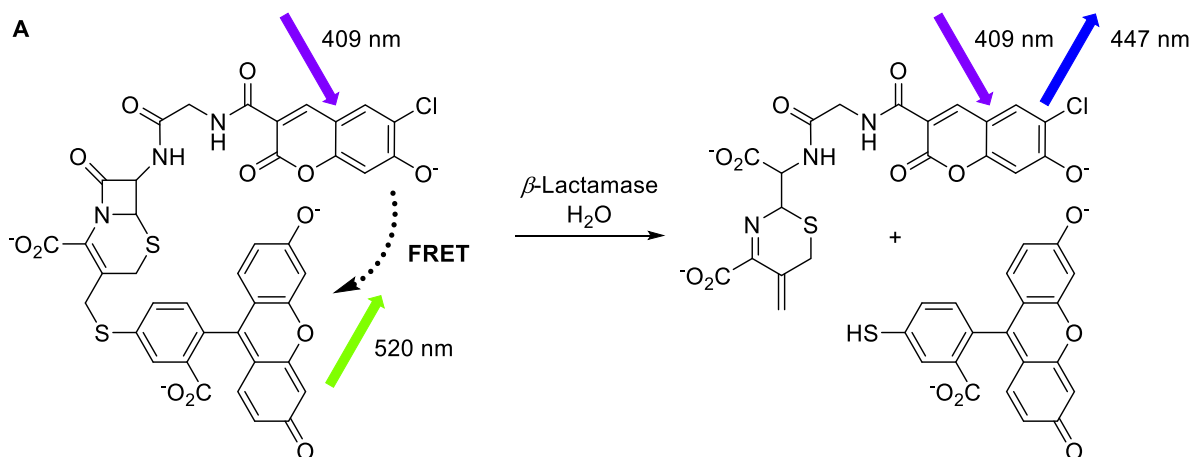


Abb. 1-21 | A | Pionierarbeit zum Nachweis von  $\beta$ -Lactamase-Aktivität mithilfe einer FRET-Sonde.<sup>[134]</sup>

Dasselbe Paar von Fluorophoren diente KIKUCHI *et al.* auch zum Nachweis von Phosphodiesterase-Aktivitäten.<sup>[142]</sup> Weitere wichtige Arbeiten auf dem Gebiet erfolgten durch die Arbeitsgruppen SCHULTZ zum *monitoring* der Phospholipase-Aktivität ( $RC \sim 30$ )<sup>[135]</sup> und ARENZ mit der Synthese einer Sonde der sauren Ceramidase ( $RC \sim 10$ ).<sup>[143]</sup> Beide nutzten die Kombination aus NBD und NR als FRET-Paar (siehe Abb. 1-22).

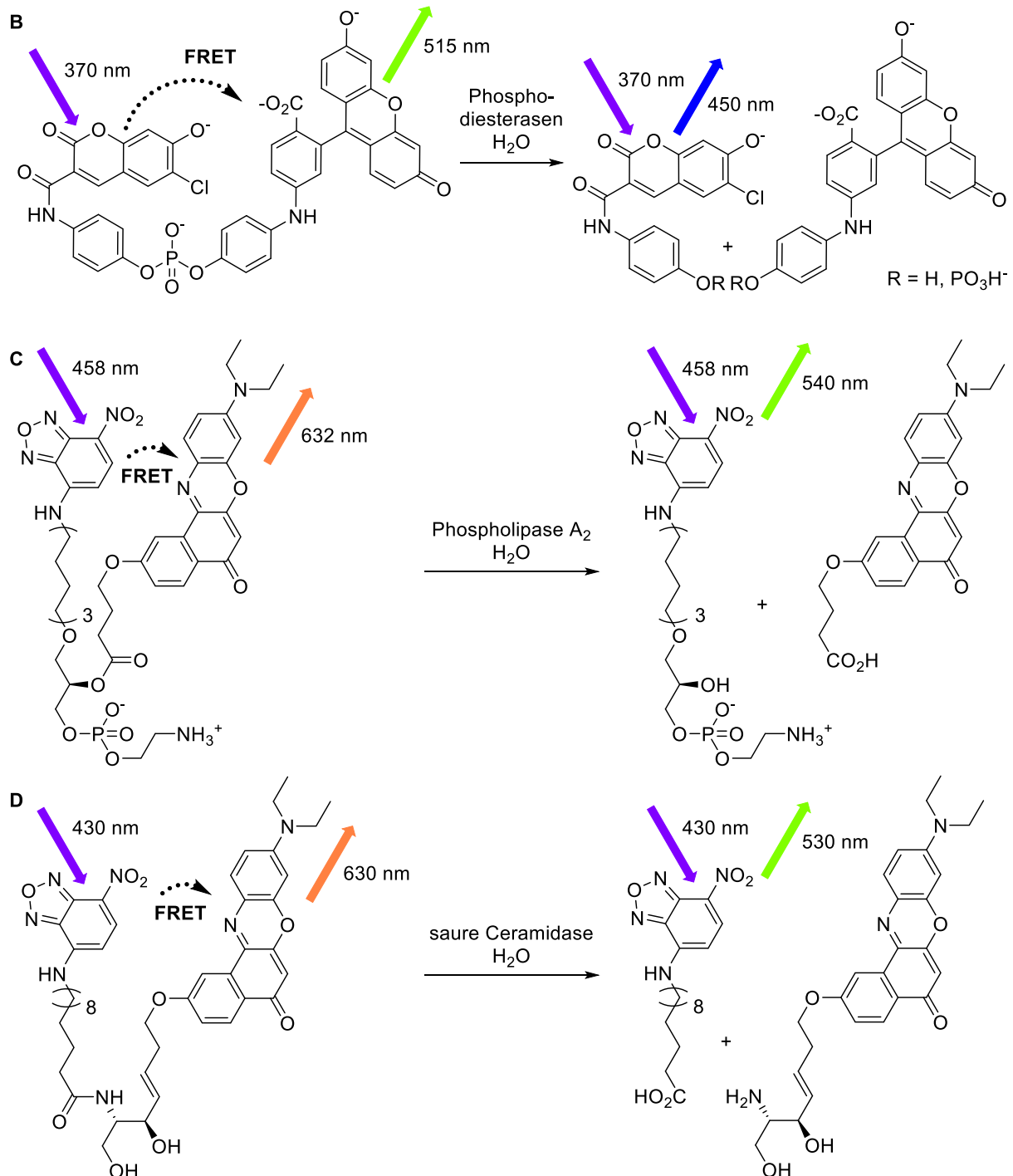


Abb. 1-22 | Funktionsweise von FRET-Sonden zum fluoreszenzspektroskopischen Nachweis der Aktivität von **B** | Phosphodiesterasen<sup>[142]</sup> **C** | Phospholipase  $A_2$ <sup>[135]</sup> sowie **D** | saurer Ceramidase.<sup>[143]</sup>

### 1-5-7 | Multiphotonenmikroskopie (MPM)

Eine moderne Variante der Fluoreszenzmikroskopie nutzt ein *laser scanning microscope* in Kombination mit Multiphotonenfluoreszenzanregung (2PE bzw. MPE). Letztere beruht auf Mehr- oder Multiphotonenabsorptionsprozessen die MARIA G. GÖPPERT-MAYER bereits 1931 vorhergesagt hatte.<sup>[144]</sup>

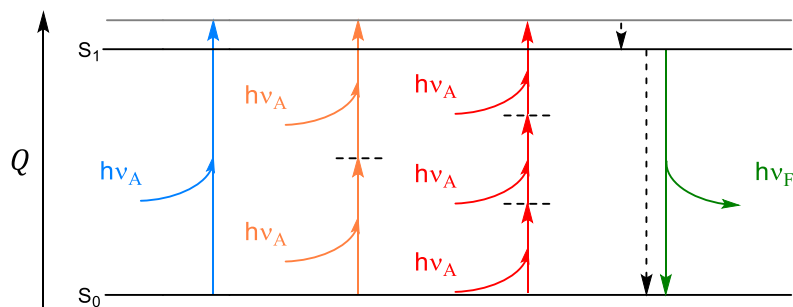


Abb. 1-23 | JABŁOŃSKI-Schema der Multiphotonenabsorption | Die Energie der beteiligten Photonen wird durch Länge und Farbe der Pfeile angedeutet. blau: Einphotonenanregung  $n = 1$ , orange und rot: Multiphotonenabsorptionsprozesses unter Beteiligung von  $n = 2$  bzw.  $n = 3$  Photonen, grün: Fluoreszenzemission, modifiziert nach LAKOWICZ.<sup>[64]</sup>

Im Fall der Multiphotonenabsorption (siehe Abb. 1-23) werden durch Absorption eines Photons mit etwa einem  $n$ -tel der für den Anregungsvorgang benötigten Energie (und also etwa  $n$ -facher Wellenlänge) ultrakurzlebige virtuelle Anregungszustände erzeugt. Diese können weitere quasi gleichzeitig, innerhalb von  $10^{-16}$  s, eintreffende Photonen mit derselben Energie absorbieren, bis final ein realer angeregter Zustand erreicht wird.<sup>[64,145]</sup> Um das Prinzip nutzbar zu machen,<sup>[146,147]</sup> sind in der Praxis hohe Photonendichten erforderlich, um die Auftrittswahrscheinlichkeit des Multiphotonenabsorptionsprozesses zu erhöhen. Dazu finden spezielle (IR)-Laser mit  $\lambda = 700\text{-}1300$  nm Anwendung. Verfügbarkeit und Verbreitung entsprechender Systeme haben trotz der hohen Kosten stark zugenommen, denn die Verwendung dieser Technik bietet im Hinblick auf Biokompatibilität, Eindringtiefe und Streulicht einige Vorteile im Vergleich zur klassischen Epifluoreszenzmikroskopie oder der konfokalen Laserrastermikroskopie mit Einphotonenanregung. Während letztere kurz- und mittelwelliges Licht (UV/Vis) zur Anregung nutzt, erfordert 2PE deutlich weniger phototoxische, langwellige IR-Strahlung. Dies schont das meist biologische Material unter den Beobachtungsbedingungen. Dazu trägt zusätzlich bei, dass nur ein Bruchteil der gesamten Probe beleuchtet und mithin auch geblichen wird, da die erforderliche Photonendichte bei 2PE nur in einem sehr kleinen Bereich im optischen Fokus des Lasers erreicht wird. Deshalb stammt emittierte

Fluoreszenz ausschließlich aus der betrachteten Ebene, wodurch störendes Streulicht stark reduziert wird und meist auf die Verwendung einer Detektionslochblende (*pin hole*) verzichtet werden kann. Da die RAYLEIGH-Streuung von Photonen proportional zu  $(c_0/\lambda)^4$  ist, wird zudem das einfallende langwellige Licht bei Zweiphotonenanregung 16-mal schwächer an der Probe gestreut als bei Einphotonenanregung.<sup>[147]</sup> Gleichzeitig sinkt aber die von  $\lambda$  abhängige maximale optische Auflösung um bemerkenswerte 50%. Die schwächere Streuung ermöglicht unter günstigen Umständen auch die Beobachtung von bis zu 1000  $\mu\text{m}$ <sup>[148]</sup> tief unter der Oberfläche liegenden Schichten (*deep tissue imaging*). Durch Rasterverfahren können so nicht nur Oberflächen, sondern auch kleine 3D-Objekte (Gewebe, kleine Organismen wie Insekteneier, Larven, Würmer) abgebildet werden, weshalb sich die Methode steigender Beliebtheit erfreut.

Eine Einschränkung erfährt die 2PE durch das Anspruchsverhalten der genutzten Fluorophore. Zwar sind viele bekannte Fluorophore aus der Einphotonenanregung auch für 2PE nutzbar, allerdings unterscheiden sich ihre Zweiphotonenwirkungsquerschnitte  $\sigma_2$  teils erheblich. Deshalb ist die Sensitivität teils suboptimal. Bislang existiert kein rationaler Zugang zum gezielten Design von Fluorophoren mit hohen  $\sigma_2$ -Werten, weshalb derzeit viel Arbeit in die Entwicklung von 2PE-Fluorophoren investiert werden muss (und wird).<sup>[123]</sup>

Da die lokale Fluorophor-Konzentration bei fluoreszenzmikroskopischen Experimenten mit FRET-Sonden nicht exakt bekannt ist, geben insbesondere Bilder des Verhältnisses der Intensität des Donors bezogen auf die Intensität des Akzeptors (*ratio images*) wertvolle Einblicke in das Geschehen auf molekularer Ebene.<sup>[64]</sup>



## 2 | Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Synthese und Charakterisierung von Werkzeugen zur Untersuchung des Lipidstoffwechsels, die direkte Einblicke in das Geschehen auf molekularer Ebene liefern. Der Fokus der Arbeiten lag auf der sauren Sphingomyelinase, deren Studium aufgrund ihrer enigmatischen Rolle im Zusammenhang mit der Lipid-medierten Signalübertragung (*lipid signaling*) neuer Ansätze bedarf. Darum sollten Moleküle und Methoden entwickelt werden, die eine zeitaufgelöste zerstörungsfreie Detektion der Aktivität dieses Enzyms im Reagenzglas und in der lebenden Zelle erlauben, wie sie in Abb. 2-1 schematisch gezeigt ist.

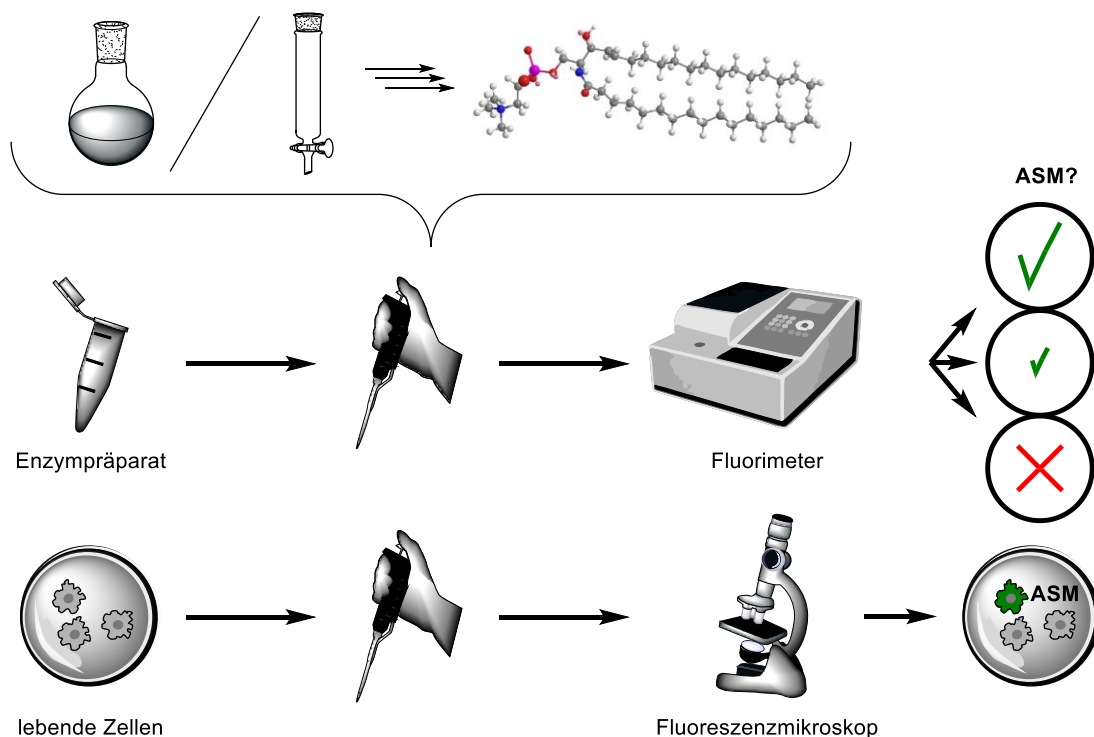


Abb. 2-1 | Zielstellung der vorliegenden Arbeit war die chemische Synthese von Sphingomyelin-Analoga zur Anwendung in der fluorimetrischen und fluoreszenzmikroskopischen Verfolgung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase.

Zu diesem Zwecke sollten fluoreszent markierte Sphingomyelin-Analoga als potentielle Substrate der sauren Sphingomyelinase (Abb. 2-2, oben) dargestellt werden, wobei der Schwerpunkt auf der Entwicklung von Molekülen mit der Fähigkeit zu FRET lag. Dabei galt es, die Polarität und die Stereochemie des natürlichen Substrats Sphingomyelin zu imitieren und so den Erhalt der Substraterkennung trotz dualer Fluoreszenzmarkierung zu gewährleisten. Nach dem Prinzip einer FRET-Sonde sollten die angestrebten Phospholipide anschließend dazu dienen, die Anwesenheit der sauren Sphingomyelinase

durch die spektroskopischen Änderungen zu detektieren, welche die durch dieses Enzym katalysierte Trennung des FRET-Paares bewirkt (siehe Abb. 2-2, unten).

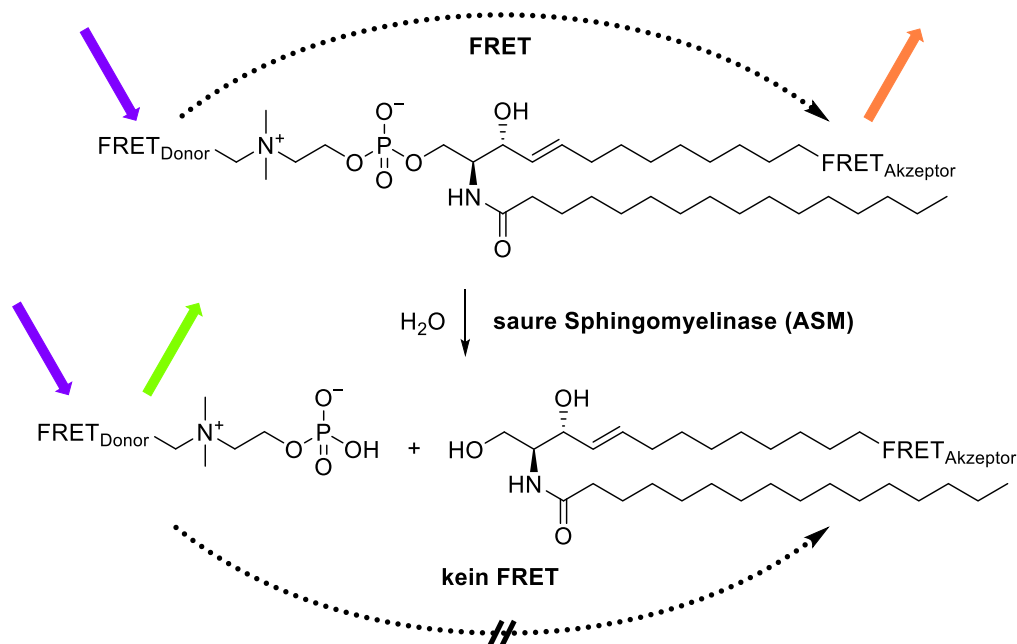


Abb. 2-2 | Das Wirkprinzip der angestrebten FRET-Sonde der sauren Sphingomyelinase (oben) beruht auf der irreversiblen Hydrolyse des Phosphodiesters in Anwesenheit des zu untersuchenden Enzyms. Im Gegensatz zum intakten Molekül erlaubt die räumliche Entfernung der dabei gebildeten, hypothetischen Reaktionsprodukte (unten) keinen FRET.

Auf Basis der fluoreszenzspektroskopischen Quantifizierung des FRET sollten Strategien zur parallelisierten Bestimmung der Sphingomyelinase-Aktivität in einem homogenen Assay entwickelt werden, um so radiochemische Methoden zu ergänzen oder abzulösen. Zudem erlauben FRET-Sonden im Idealfall eine parallele Detektion von Substrat und Produkt einer enzymatischen Reaktion und schaffen so die Voraussetzungen, um Enzymaktivitäten auch mittels Fluoreszenzmikroskopie zu verfolgen. Mittelfristig könnten mithilfe der angestrebten Phospholipide Orte und Einflussfaktoren der Sphingomyelinase-Aktivität studiert werden, um einige strittige Punkte des aktuellen Wirkmodells dieses Enzyms aufzuklären.

Ferner sollten synthetische Standards der korrespondierenden Phosphorylcholin- und Ceramid-Analoga (Abb. 2-2, unten) als Referenzverbindungen zur Charakterisierung der Sonden dargestellt werden. Mit ihrer Hilfe sollten die Hydrolyseprodukte der Sonden zweifelsfrei mittels fluoreszenzspektroskopischer und chromatographischer Methoden identifiziert werden. Im Rahmen von Kooperationsprojekten sollten daneben Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase sowie weitere Sphingolipid-Analoga bereitgestellt werden.

### 3 | Ergebnisse & Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschreibt die chemische Synthese und ausführliche spektroskopische Charakterisierung von fluoreszent markierten und teilweise zu FRET befähigten Sphingomyelin-, Ceramid- und Phosphorylcholin-Derivaten, sowie deren Nutzung zur Messung der Sphingomyelinaseaktivität. Dazu wurde ein homogener, fluorimetrischer *in vitro* Assay entwickelt und fluoreszenzmikroskopische Experimente an lebenden Fibroblasten-Kulturen durchgeführt. Begleitend dienten Dünnschichtchromatographie (DC) und Massenspektrometrie-gekoppelte Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC-MS) zur Verifizierung der Ergebnisse.

#### 3-1 | Synthese der ASM-Sonden

Zur Entwicklung einer FRET-Sonde der sauren Sphingomyelinase wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt.

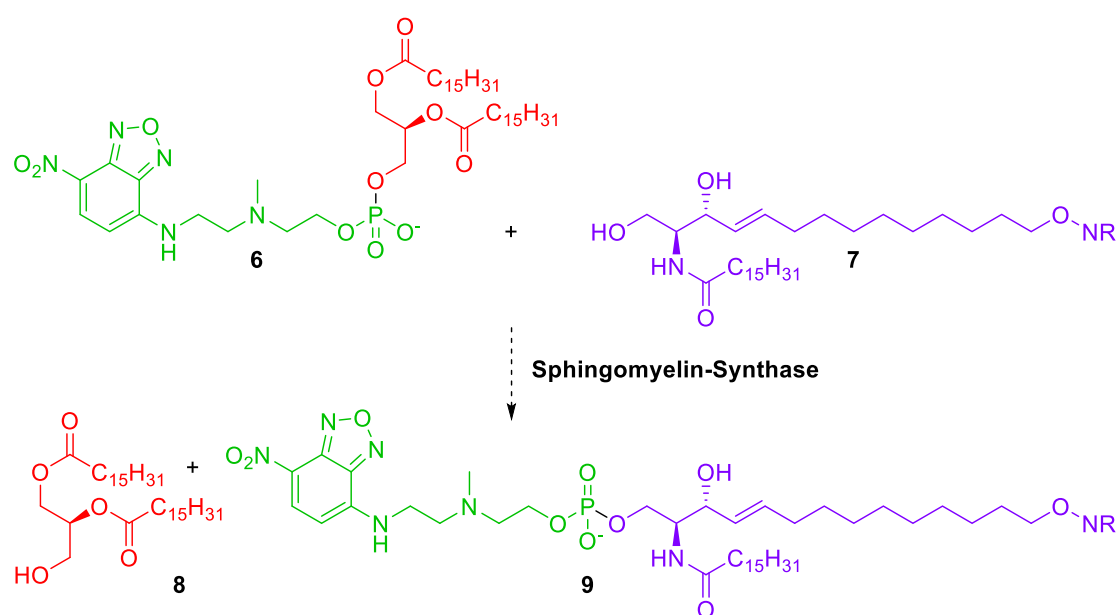


Abb. 3-1 | **Ansatz A** | Darstellung des Sphingomyelin-Analogons **9** als potentielle FRET-Sonde der ASM mittels SMS-katalysierter Umesterung des Phosphodiesters zwischen NBD-markiertem Phosphatidylcholin **6** und im Sphingosin-Rückgrat NR-markiertem Ceramid **7**.

**Ansatz A** verfolgte die Imitation der Sphingomyelin-Biosynthese wie sie in Abb. 3-1 dargestellt ist. Vermittelt durch die Sphingomyelin-Synthase (SMS) sollte dazu die NBD-haltige Kopfgruppe eines fluoreszent markierten Phosphatidylcholins **6**

auf ein NR-markiertes Ceramid **7** übertragen werden. Das so gewonnene Phospholipid **9** sollte im Anschluss auf seine Eignung als Substrat der sauren Sphingomyelinase (ASM) getestet werden. Der Charme dieser konvergenten Methode liegt darin, aus einfach Fluoreszenz-markierten synthetischen SMS-Substraten durch einen enzymatischen Schritt die angestrebte ASM-Sonde zu generieren und dabei möglicherweise für beide Enzyme (SMS und ASM) nützliche Nachweismethoden zu entwickeln. Zur Synthese der Ausgangsverbindungen konnte größtenteils auf publizierte Ergebnisse und Erfahrungen aus der Arbeitsgruppe zurückgegriffen werden. Kurz zusammengefasst sollten ein Phosphatidylcholin-Analogon **6** mit dem Fluoreszenzfarbstoff NBD in der Kopfgruppe und ein etabliertes, mit NR markiertes Ceramid **7** in Gegenwart überexprimierter Sphingomyelinsynthase aus Hefezelllysaten zur Reaktion gebracht werden. Die Synthese des NBD-markierten Phosphatidylcholin-Analogons **6** erwies sich als anspruchsvoll, es gelang jedoch die Isolation kleiner Mengen der benötigten Verbindung. Das im Sphingosin-Rückgrat NR-markierte Ceramid **7** konnte in Anlehnung an Literaturvorschriften<sup>[119]</sup> in ausreichenden Mengen dargestellt werden. Dieser Ansatz lieferte aufgrund von Problemen bei der finalen enzymatischen Übertragung der NBD-haltigen Kopfgruppe nicht das geplante Molekül **9** und wird hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt. Wahrscheinlich waren die Modifikationen an den Substraten zu drastisch um die Substraterkennung durch die SMS aufrechtzuerhalten. Zusätzlich erschwerten das Vorliegen alternativer natürlicher Substrate im lysathaltigen Reaktionsmedium und die damit einhergehende statistische Verteilung möglicher Produkte die Gewinnung substanzieller Mengen des gewünschten zweifach markierten Sphingomyelins **9**. Trotz der geschilderten Probleme wurden speziell für die Darstellung unsymmetrischer Phosphodiester mittels *H*-Phosphonat-Chemie<sup>[91]</sup> und ihre säulenchromatographische Trennung wertvolle Erkenntnisse gewonnen, die spätere Synthesen von *H*-Phosphonaten verschiedener Sphingosin-Analoga erleichterten. Besonders erwähnenswert ist die Nützlichkeit des Reagenzes 2-Chlor-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxid (NPCl) zur Kondensation eines ersten Alkohols mit Phosphonsäure, sowie zur anschließenden Kondensation des gebildeten *H*-Phosphonates mit einem zweiten Alkohol. Einige im Rahmen dieses Ansatzes synthetisierte, neue Verbindungen sind im experimentellen Teil erfasst.

**Ansatz B** verfolgte die vollsynthetische Darstellung der geplanten ASM-Sonde, wobei sowohl die Anzahl der notwendigen linearen Stufen als auch ihre Gesamtzahl deutlich

stieg. Zunächst galt es, praktikable Methoden und eine Schutzgruppenstrategie zu etablieren, die die Synthese von **9** erlauben. Dabei konnte jedoch keine Strategie gefunden werden, die es erlaubte zunächst NR im Sphingosin-Teil des Moleküls zu installieren und im Anschluss einen Phosphodiester zu knüpfen. Da auch der umgekehrte Fall praktisch nicht durchführbar war, wurde ersatzweise eine Strategie zur Einführung der NR-Markierung im Fettsäurerest (siehe Abb. 3-2) entwickelt. Zwar liegt so zwischen den beiden Fluorophoren eine zusätzliche, potentiell enzymlabile Amid-Gruppe, jedoch vermeidet dieses Arrangement mögliche Probleme bei der Substraterkennung durch die ASM, denn dort zeigt natürliches Sphingomyelin eine gewisse Variationsbreite, während das Sphingosin-Rückgrat invariant auftritt. In diesem Teil des Moleküls sollte die geplante Modifikation folglich eher toleriert werden. Zudem verringerte sich auf diese Weise die Anzahl der zu handhabenden lichtempfindlichen Intermediate drastisch.

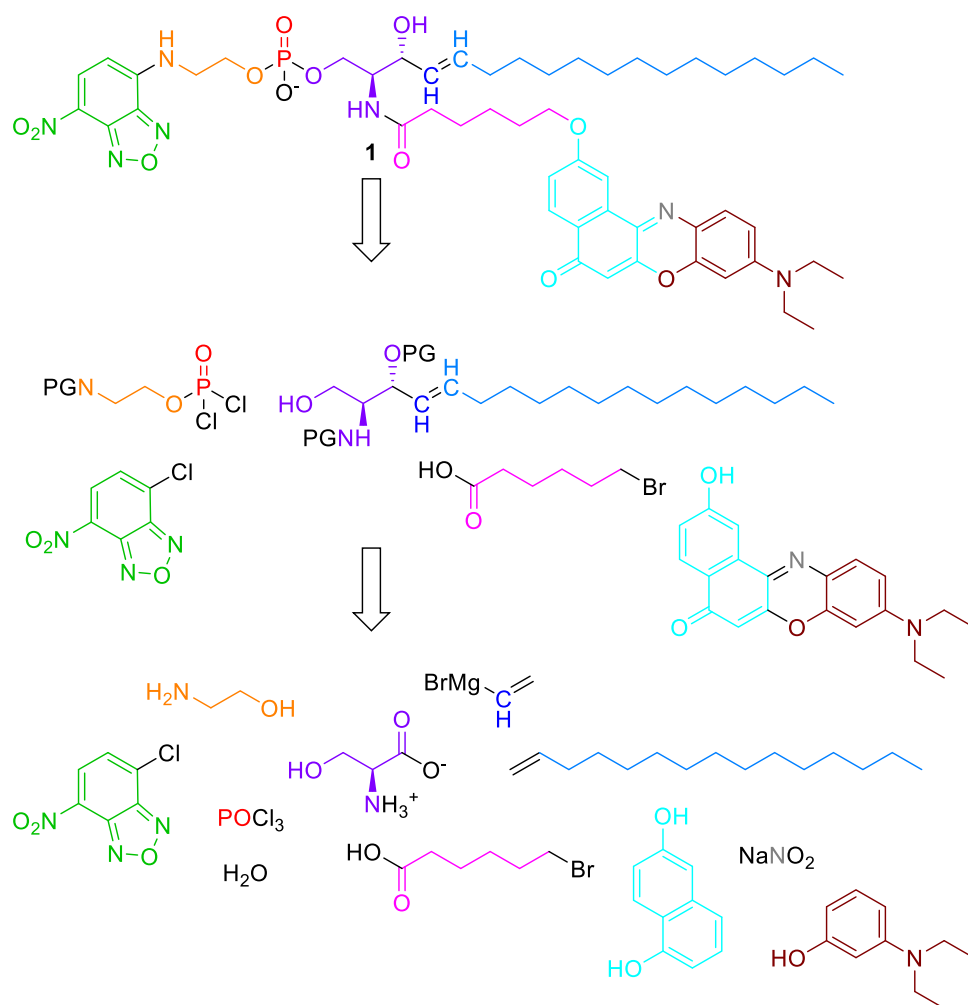


Abb. 3-2 | **Ansatz B** | Darstellung der angestrebten FRET-Sonde mittels chemischer Totalsynthese. Gezeigt ist ein Überblick über die retrosynthetische Zerlegung von Sonde **1** in kommerziell verfügbare Syntheseäquivalente, PG = Schutzgruppe.

Nach Analyse des neuen Zielmoleküls (einen beispielhaften Überblick zeigt Abb. 3-2) wurde ein modularer Synthesepfad entworfen und in folgende Teilschritte gegliedert, die im folgenden Abschnitt (Kapitel 3-1-1 bis 3-1-5) näher diskutiert werden:

- 1.) Synthese der Cholin-ähnlichen Kopfgruppe
- 2.) Synthese fluoreszierender Fettsäurederivate
- 3.) stereoselektive Synthese von Sphingosin mittels Olefinmetathese
- 4.) Knüpfung des Phosphodiesters
- 5.) Installation der Fluorophore

Der dargelegte Synthesepfad wies einige Unwägbarkeiten auf, denn für die meisten Syntheseschritte (z.B. die Synthese des asymmetrischen Phosphodiesters) existierten nur entfernt ähnliche Vorarbeiten, deren Übertragung auf das spezielle Problem aufgrund des Lipidcharakters des Zielmoleküls nur eingeschränkt möglich war. Im Verlauf der Arbeiten ergab sich die Notwendigkeit, den NR-Fluorophor durch 7-Methoxycumarin-3-carboxylat (MCC) zu ersetzen. Da die Einführung der fluoreszenzmarkierten Fettsäure jedoch auf der letzten Stufe der Synthese erfolgt, waren dazu keine Abänderungen der Syntheseroute erforderlich. Faktisch bietet das letzte Intermediat dieser Route die größtmögliche Freiheit beliebige (modifizierte) Carbonsäuren am Amin-Stickstoff zu installieren. Dadurch ist eine gegenüber Ansatz A deutlich erhöhte Flexibilität gegeben, die eine zukünftige Weiterentwicklung der hier vorgestellten Sonden z.B. durch Austausch des Fluorophors oder Verringerung/Erhöhung der Zahl der Methyleneinheiten der Fettsäure erleichtert.

In den folgenden Abschnitten wird die Synthese der Sonde diskutiert, wobei an einigen Stellen Teile der letztendlich nicht erfolgreichen, aber dokumentationswürdigen Versuche, etwa zur Synthese von Sphingosyl-*H*-phosphonaten vorgestellt werden.

### **3-1-1 | Synthese der Cholin-ähnlichen Kopfgruppe**

Um das natürliche ASM-Substrat Sphingomyelin in Hinblick auf Polarität und Raumanspruch bestmöglich nachzuahmen, wurde zunächst eine kleine Kollektion maskierter und NBD-markierter Cholin-Präkursoren generiert (siehe Abb. 3-3). Dabei erschwerte die hohe Polarität der gebildeten Amin- und Ammoniumverbindungen ihre Gewinnung in ausreichender Menge und Reinheit. In einigen Fällen leisteten Kristallisation oder Vakuumdestillation gute Dienste. In den übrigen Fällen wurde auf Normalphasen-

chromatographie in Verbindung mit alkoholisch-wässrigen mobilen Phasen zurückgegriffen. Die gezeigten Verbindungen wurden mittels  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ - und ggf.  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie sowie HRMS charakterisiert.

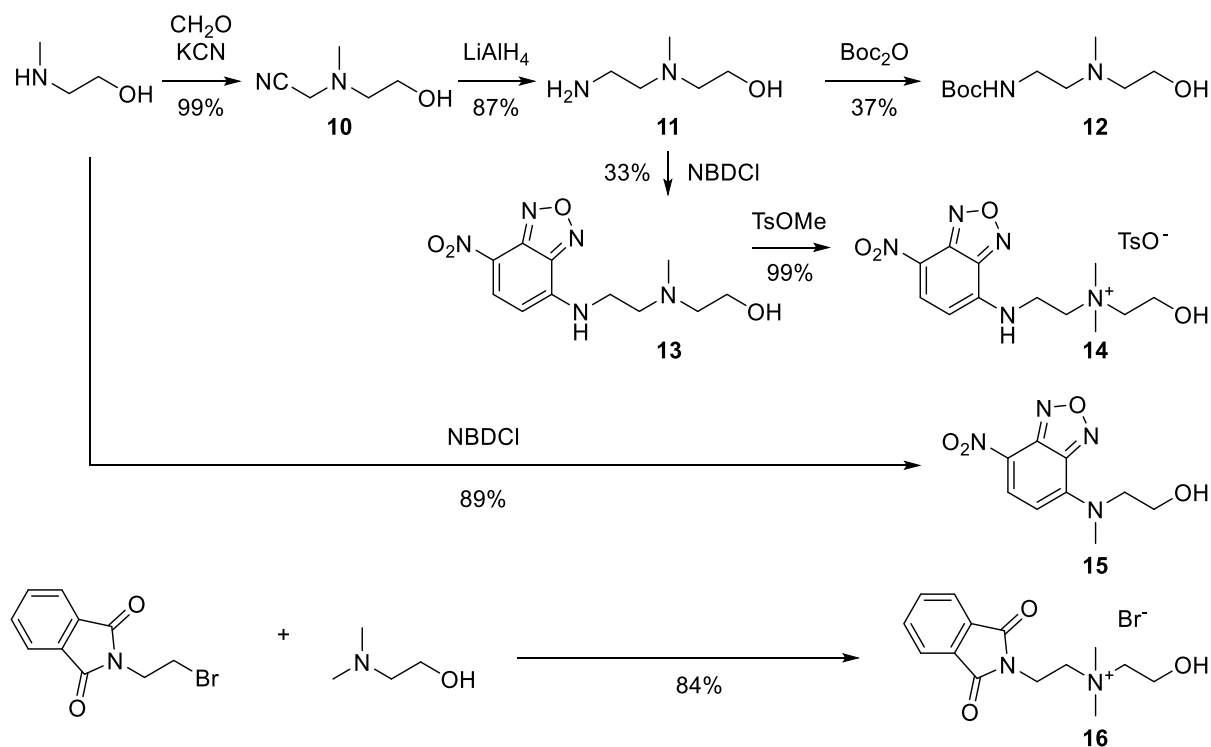


Abb. 3-3 | Syntheschema zur Darstellung einer Kollektion markierter und geschützter Aminoethanol-Derivate als Präkursoren der Cholin-ähnlichen Kopfgruppe der angestrebten FRET-Sonde.

Zum Aufbau des 2-(2-Aminoethyl(methyl)amino)ethanol-Grundkörpers **11** erfolgte zunächst eine STRECKER-ähnliche Reaktion von 2-(Methylamino)ethanol mit Formaldehyd und Kaliumcyanid in Bisulfitlauge (Abb. 3-3). Sie lieferte das benötigte Nitril **10** nach einfacher organischer Extraktion der wässrigen Reaktionsmischung in hervorragender Ausbeute. Im Anschluss wurde **10** mit  $\text{LiAlH}_4$  reduziert und mittels Kugelrohrdestillation das gewünschte Intermediat **11** in exzellenter Ausbeute von 87% mit hoher Reinheit erhalten. Diese Verbindung wurde entweder mit  $\text{Boc}_2\text{O}$  maskiert um **12** zu gewinnen oder mit NBDCI zum fluoreszierenden Derivat **13** umgesetzt. Es gelang, aus mit  $\text{CHCl}_3$  unterschichteter methanolischer Lösung Kristalle der Verbindung in Form feiner Nadeln zu kristallisieren. Die in Abb. 3-4 gezeigte röntgenographische Analyse der Verbindung bestätigt die Struktur. Mit **15** konnte auch ein verkürztes Analogon von **13** durch die direkte Reaktion von Methylaminoethanol mit NBDCI in sehr hoher Ausbeute gewonnen werden.

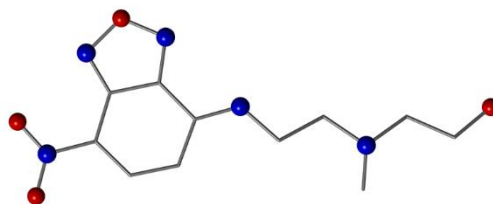


Abb. 3-4 | Röntgenkristallstruktur der Verbindung **13** | rot: O, blau: N, alle anderen: C, aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde H nicht abgebildet.

Die Reaktion von Intermediat **13** mit *para*-Toluensulfonsäuremethylester lieferte, im Gegensatz zu vorangegangenen Versuchen mit Iodmethan auch das korrespondierende quaternäre Ammoniumsalz **14**. Eine weitere maskierte Ammoniumverbindung **16** wurde nach Alkylierung des tertiären 2-*N,N*-Dimethylaminoethanols in guter Ausbeute isoliert. Die quaternären Verbindungen **14** und **16** kristallisierten nach beendeter Reaktion in reiner Form aus, da sie praktisch unlöslich in organischen Lösungsmitteln sind. Dies erleichterte zwar ihre Isolation, es limitierte aber auch ihre weitere Verwendung in nicht-wässrigen Lösungsmitteln.

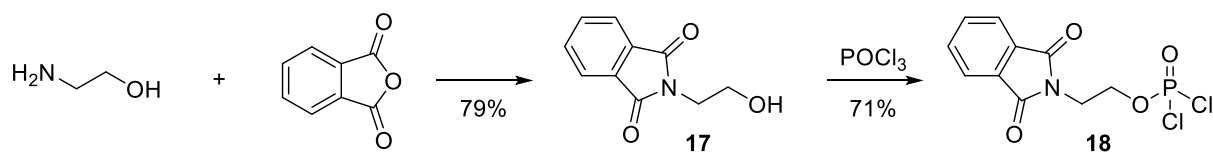


Abb. 3-5 | Synthese eines geschützten Aminoethylphosphorodichloridats **18** nach HIRT und BERCHTOLD.<sup>[90]</sup>

Zur Vorbereitung der Phosphodiester-Bildung durch Phosphorodichloridat-Chemie wurde Intermediat **17** aus 2-Aminoethanol gewonnen, aus siedendem Toluol kristallisiert und wie in Abb. 3-5 gezeigt zu Reagenz **18** umgesetzt.<sup>[90]</sup> Ohne Ausbeuteverluste erfolgte die Reaktion von **17** mit  $\text{POCl}_3$  auch in Toluol anstelle des in der Originalvorschrift als Lösungsmittel verwendeten Benzens. Durch Kristallisation aus wasserfreiem Diethylether wurde das Phosphorodichloridat **18** als farbloser Feststoff mit einer guten Ausbeute von 56% über zwei Stufen isoliert. NMR-Spektroskopie der Verbindung in  $\text{CDCl}_3$  zeigte korrespondierende Kopplungskonstanten  $J^{\text{HP}}$  von etwa 10.5 Hz sowohl im  $^1\text{H}$ - als auch im  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum, die in einer Triplet-Aufspaltung des nicht Protonen-entkoppelten  $^{31}\text{P}$ -Signals bei 8 ppm resultierten (siehe Abb. 3-6). Die Abwesenheit weiterer Signale und Kopplungen belegt die von HIRT und BERCHTOLD vorgeschlagene Struktur.<sup>[90]</sup> Folglich konnte die erfolgreiche Bildung der phosphororganischen Verbindung **18** nachgewiesen und die erste Hürde zur Synthese eines asymmetrischen Phosphodiesters genommen werden.



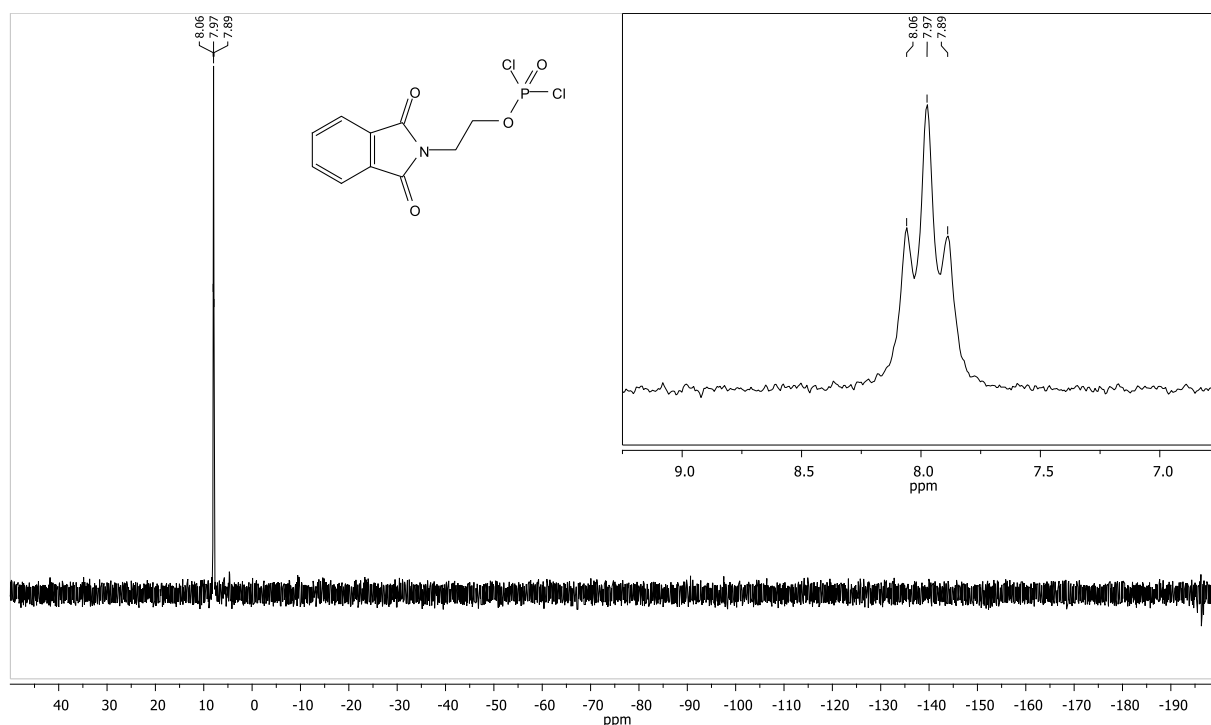


Abb. 3-6 |  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektrum von **18** und Vergrößerung des diskutierten Signals (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

### 3-1-2 | Fluoreszierende Fettsäure-Derivate

Wie in Abb. 3-7 gezeigt, wurde basierend auf Vorarbeiten<sup>[117,149]</sup> durch Nitrosylierung von 3-Diethylaminophenol und anschließende Kondensation des so gebildeten Phenols **19** mit einem Naphthol zunächst das Nilrot-Derivat **20** in einer Ausbeute von 30% über zwei Stufen dargestellt.

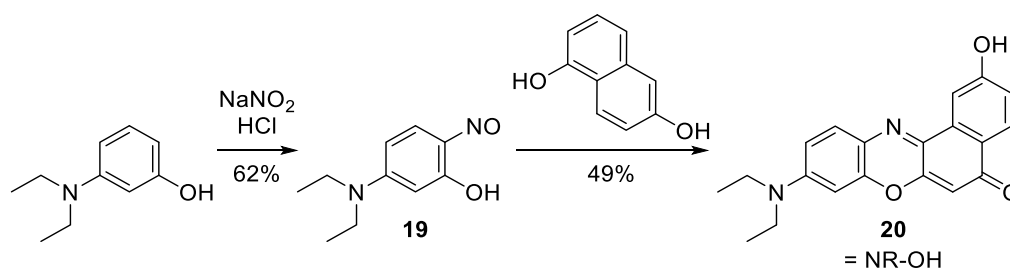


Abb. 3-7 | Synthese von 2-Hydroxy-Nilrot **20** (NR-OH) nach <sup>[117,149]</sup>.

Der Farbstoff **20** wurde im Anschluss mit 6-Bromhexansäuremethylester unter basischen Bedingungen alkylert um **21** zu gewinnen (siehe Abb. 3-8).<sup>[119]</sup> Damit die anschließende Hydrolyse des Esters den Fluorophor intakt lässt, ist eine wasserfreie Methode unabdingbar. Darum dient Kaliumtrimethylsilanolat zur Hydrolyse des aufgrund seiner leichten

Verfügbarkeit bisher meist verwendeten Methylesters **21**.<sup>[119]</sup> Diese Methode erwies sich in der Praxis aber als langsam und unzuverlässig, weshalb Alternativen untersucht wurden. Die Spaltung des Esters **21** mit wasserfreiem Lithiumiodid in siedendem Pyridin gelang, die Reaktionszeiten waren jedoch unbefriedigend. Eine Modifikation der Route führte schließlich zum Erfolg, indem anstelle eines Methylesters der *tert*-Butylester **24** eingesetzt wurde, der durch Alkylierung von **20** mit dem eigens dargestellten Ester **23** in befriedigender Ausbeute erhalten werden konnte. **24** reagierte rasch und mit exzellenten Ausbeuten unter sauren Bedingungen zur gewünschten markierten Hexansäure **22**.

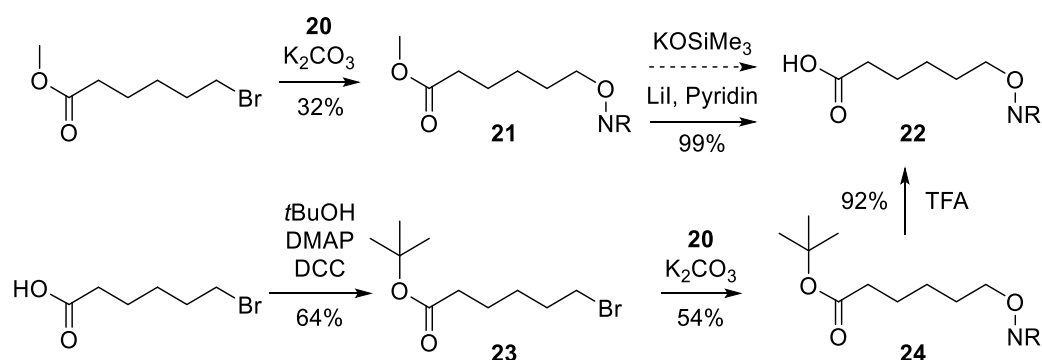


Abb. 3-8 | Darstellung von mit Nilrot (NR) fluoreszent markierter Hexansäure.

Ein MCC-markiertes Hexansäure-Derivat **25** wurde in hoher Ausbeute von 91% in einem synthetischen Schritt durch Reaktion des käuflich erhältlichen Aktivesters MCC-OSu mit 6-Aminohexansäure dargestellt (siehe Abb. 3-9). Zur Abtrennung von Nebenprodukten diente präparative Dünnschichtchromatographie (DC).

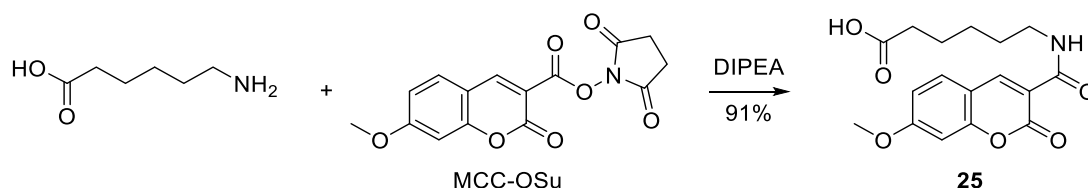


Abb. 3-9 | Synthese von mit 7-Methoxycoumarin-3-carboxylat (MCC) fluoreszent markierter Hexansäure.

Wie in Abb. 3-10 gezeigt, wurden **22** und **25** im Anschluss unter STEGLICH-Bedingungen in die Aktivester **26** und **27** überführt. Aufgrund der ausgeprägten Hydrolyseempfindlichkeit der Verbindungen verminderte Säulenchromatographie die Ausbeuten in hohem Maße. Da bereits durch Extraktion mit wässrigen, leicht sauren Puffern ein Großteil der Nebenprodukte abgetrennt werden kann, wurde zugunsten der Ausbeute auf weitere Reinigungsschritte verzichtet und die erhaltenen Aktivester direkt weiter umgesetzt.

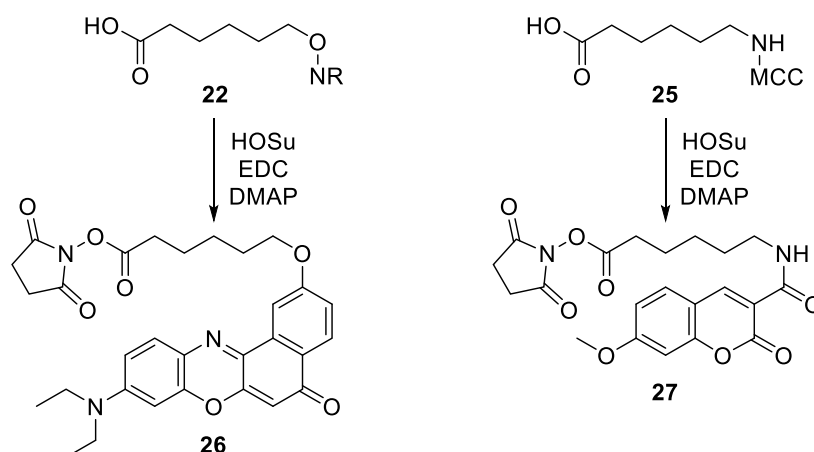


Abb. 3-10 | Aktivierung der fluorescent markierten Hexansäure-Derivate unter STEGLICH-Bedingungen.

Zusätzlich zu fluorescent markierten Fettsäuren erforderten die angestrebten Synthesen auch die Einführung der nativen Fettsäuren Laurin- und Palmitinsäure, die nach Literaturvorschrift<sup>[150]</sup> zu diesem Zwecke ebenfalls in ihre Aktivester **28** und **29** überführt wurden.

### 3-1-3 | Stereoselektive Synthese von Sphingosin

Um den zentralen 2-(2*S*,3*R*)-Aminopent-4-en-1,3-diol-Baustein mit dem benötigten Schutzgruppendedekor als Ausgangsstoff für die angestrebte Olefinmetathese zu gewinnen, wurde zunächst auf Arbeiten von GARNER und PARK<sup>[75,77]</sup> zurückgegriffen.

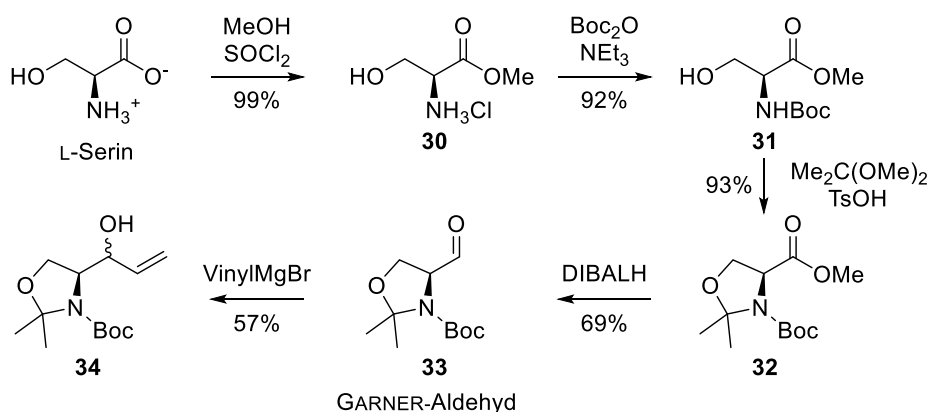


Abb. 3-11 | Synthese eines maskierten 2-(2*S*,3*R*)-Aminopent-4-en-1,3-diols, modifiziert nach <sup>[75,77]</sup>.

Ausgehend von L-Serin wurde in 58% über vier Stufen Serinal **33** gebildet, der sogenannte GARNER-Aldehyd. Dessen GRIGNARD-Reaktion mit Vinylmagnesiumbromid bei tiefen Temperaturen lieferte aufgrund geringer Stereoselektivität ein Diastereomeren-Gemisch des Allylalkohols **34** in moderater Ausbeute. Probleme bei der Trennung der Diastereomeren und die geringe Lagerfähigkeit der Verbindung infolge vielfältiger Umlagerungsmöglichkeiten machten es erforderlich, Alternativen heranzuziehen.

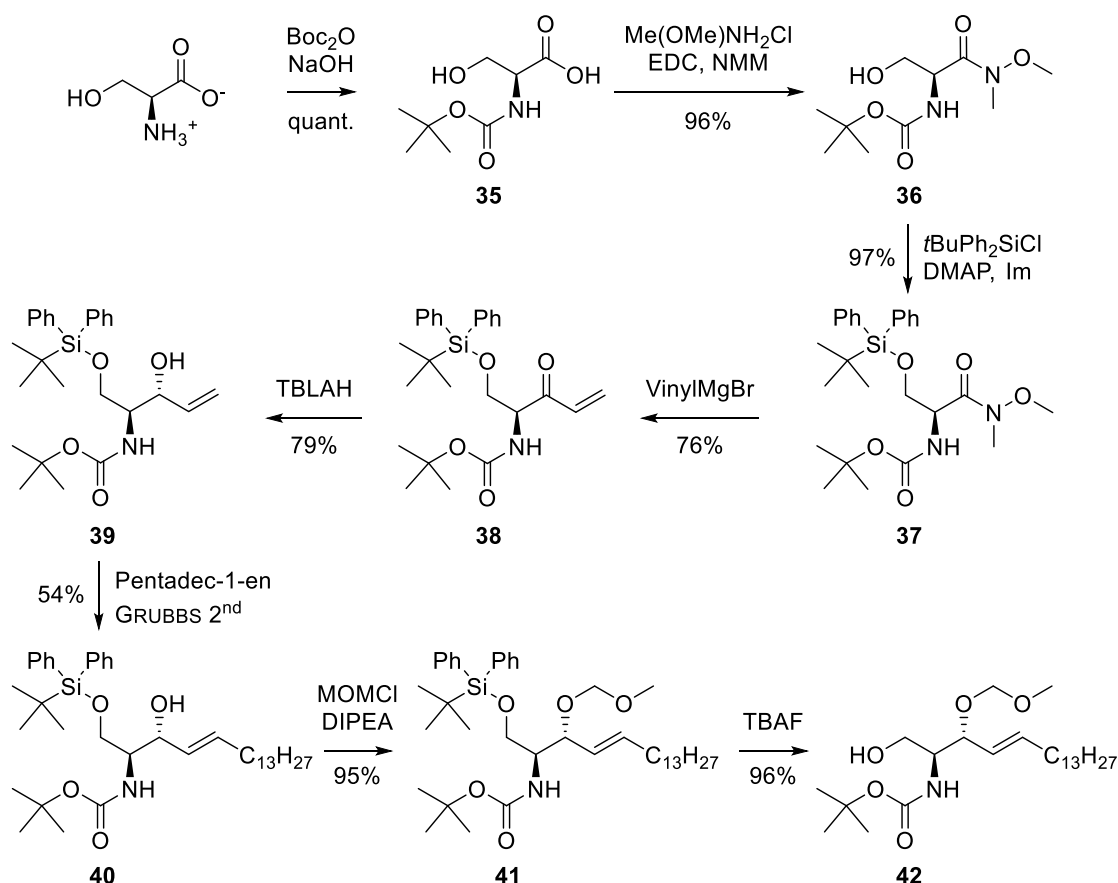


Abb. 3-12 | Stereoselektive Synthese eines geschützten Sphingosins nach [76,151,152].

Aufbauend auf Arbeiten von YAMAMOTO *et al.*,<sup>[76,153]</sup> gelang die Darstellung in höherer Qualität und Ausbeute, indem wie in Abb. 3-12 gezeigt, CC-Knüpfung und stereoselektive Reduktion voneinander getrennt wurden. Dazu wurde zunächst über drei Stufen in exzellenter Ausbeute ein geschütztes L-Serin-WEINREB-Amid **37** dargestellt, welches anschließend einer GRIGNARD-Addition unterzogen wurde. Das so erhaltene MICHAEL-System **38** wurde anschließend mit Lithium-tri-*tert*-butoxyaluminumhydrid (TBLAH), stereoselektiv reduziert. Neben einer möglichst konstant niedrigen Reaktionstemperatur von  $-84^\circ\text{C}$  hatte die Wahl des Lösungsmittels einen großen Einfluss auf das Gelingen der Reaktion. In einer sehr ähnlichen Reaktion wurde wasserfreier Ethylalkohol genutzt,<sup>[76]</sup> allerdings löst sich das Edukt **38** darin selbst  $150^\circ\text{C}$  über der Reaktionstemperatur kaum. In Methanol hingegen laufen verschiedene Nebenreaktionen ab, die unter anderem den Silylether in Mitleidenschaft ziehen. Da die Stereoselektivität der Reaktion in alkoholischen Lösungsmitteln nach bisherigem Kenntnisstand am größten ist,<sup>[76]</sup> wurde ein Ausweg gesucht, um die Reaktion in Ethylalkohol führen zu können. Dazu wurde **38** zunächst in tr. Tetrahydrofuran (THF) gelöst und unter kräftigem Rühren mit der zehnfachen Menge tr. Ethylalkohols versetzt, wobei eine feine Suspension erhalten wurde,

die einer raschen Reduktion durch TBLAH zugänglich war. Dieser Kompromiss gestattete die Gewinnung des gewünschten Allylkohols **39** in einer guten Ausbeute von 79%. Dabei waren Ausbeuteverluste weniger einer mangelnden Diastereoselektivität, sondern vielmehr einer Überreduktion des MICHAEL-Systems **38** zum korrespondierenden gesättigten Alkohol geschuldet. Dieses Nebenprodukt konnte aufgrund der großen chemischen Ähnlichkeit zum Allylkohol **39** erst in darauffolgenden Schritten vollständig abgetrennt werden. Das Intermediat **39** wurde in insgesamt 56% Ausbeute über 5 Stufen isoliert.

Um das native Sphingosin-Rückgrat zu generieren, wurde der Allylkohol **39** zusammen mit Pentadec-1-en in Anwesenheit von GRUBBS 2<sup>nd</sup>-Katalysator einer Olefinmetathese unterworfen. Dabei wurden moderate Ausbeuten erreicht, was zum Teil der bevorzugten Bildung des Homometatheseprodukts Octacos-14-en **43** geschuldet ist. Auch durch langsame Zugabe von Pentadec-1-en zur Reaktionsmischung konnten die Ausbeuten nicht gesteigert werden. Die Ausbeute von **40** verringerte sich durch die Bildung kleiner Mengen des unerwünschten Z-Alkens **Z-40**, sowie der Ketone **I-39** und **I-40**. Ein plausibler Mechanismusvorschlag der ihrer Bildung zugrundeliegenden Umlagerung ist in Abb. 3-13 wiedergegeben. Ähnliche Fälle sind aus der Literatur bekannt.<sup>[154,155]</sup>

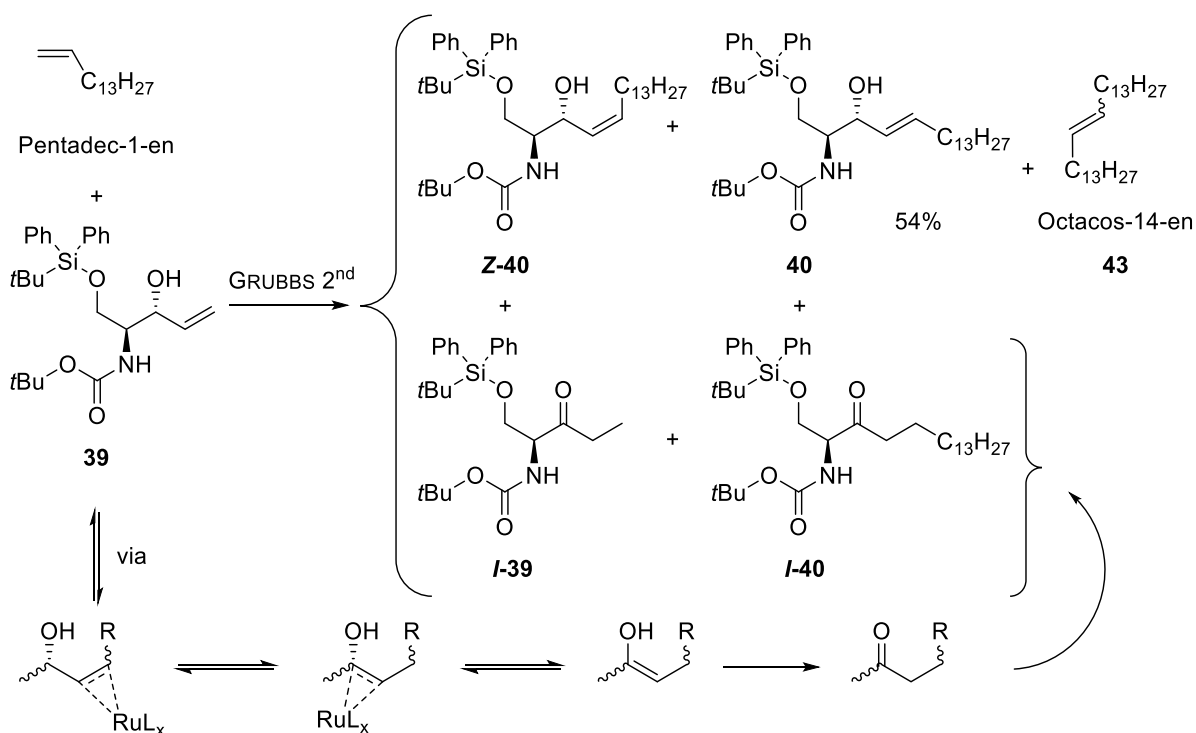


Abb. 3-13 | Nach Olefinmetathese von **39** und Pentadec-1-en mit GRUBBS 2<sup>nd</sup> detektierte Produkte, sowie ein plausibler Mechanismus<sup>[154,155]</sup> der Bildung der Keton-Nebenprodukte | R = H oder  $\text{C}_{13}\text{H}_{27}$ .

Die Bildung der Keton-Nebenprodukte **I-39** und **I-40** wird besonders durch hohe Konzentrationen von Rutheniumhydrid-Spezies favorisiert.<sup>[154]</sup> Diese konnten zwar nicht durch die Zugabe von Benzochinon<sup>[154]</sup> unschädlich gemacht werden, ihre Bildung konnte durch den Einsatz geringer Katalysatormengen jedoch vermindert werden. Auch die Inaktivierung des Katalysators nach beendeter Reaktion<sup>[156]</sup> half, die Bildung von Ketonen im Verlauf der Arbeiten erfolgreich zu minimieren und die Ausbeuten zu steigern. Alternative Ansätze, vor der Metathese die sekundäre Hydroxylgruppe zu maskieren, ergaben keine gesteigerte Effizienz der nachfolgenden Metathese. Dies liegt vermutlich daran, dass damit auch der günstige, die Reaktion beschleunigende, Effekt des Allylalkohols<sup>[154]</sup> verloren geht.

Durch Alkylierung mit (Chlormethyl)methylether (MOMCl) wurde die sekundäre, allylische Hydroxylgruppe von **40** maskiert und Verbindung **41** generiert um im weiteren Syntheseverlauf unerwünschte Reaktionen des Alkohols auszuschließen. Der Präkursor **41** diente als Plattform zur Installation von Phosphorylcholin-Analoga und/oder Fettsäurederivaten zur Synthese der FRET-Sonden (folgender Abschnitt), sowie der korrespondierenden Ceramide (siehe Kapitel 3-2).

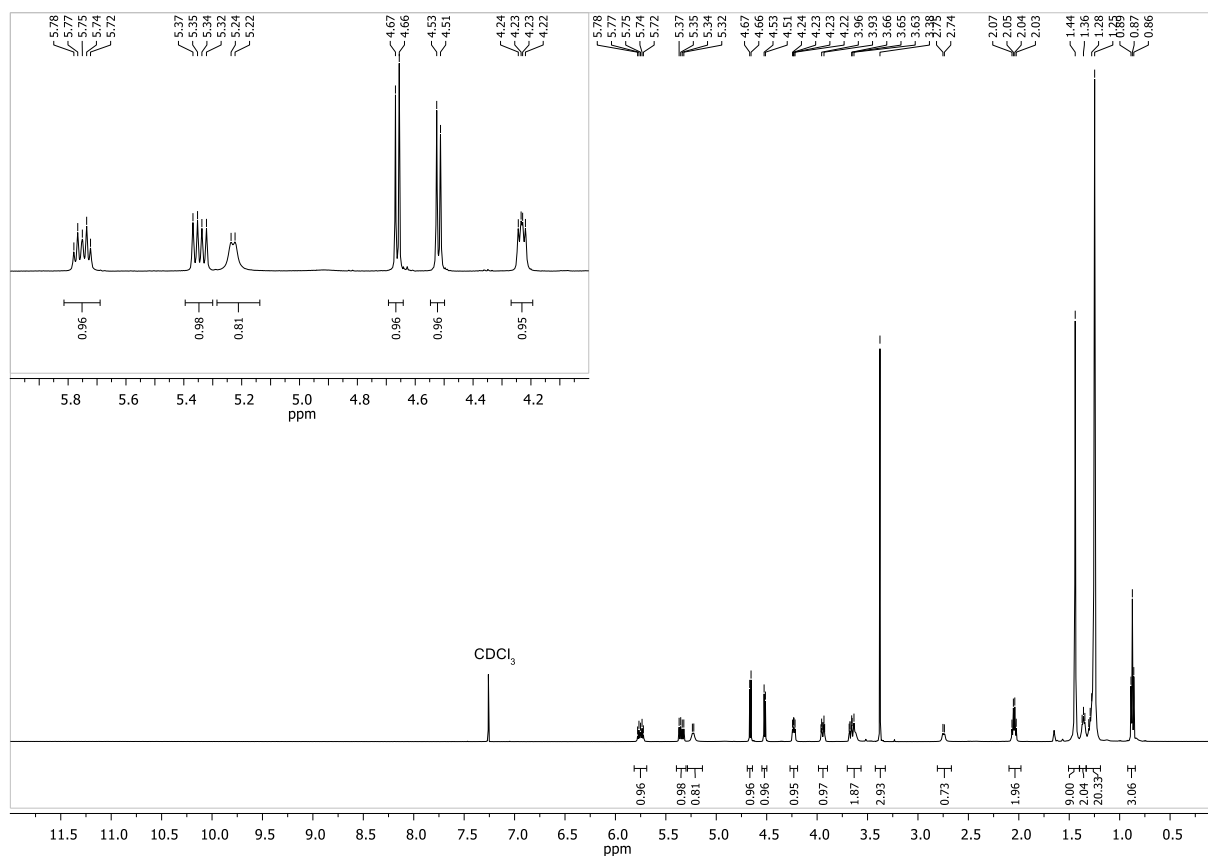


Abb. 3-14 | <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum von **42** mit Vergrößerung des Ausschnittes von 4.0-6.0 ppm (500 MHz).

Zur Vorbereitung der anschließenden Phosphorylierung wurde die primäre Hydroxylgruppe von **41** durch Desilylierung mit Tetrabutylammoniumfluorid (TBAF) freigelegt. So wurde das geschützte Sphingosin **42** in einer Ausbeute von 27% über 8 Stufen ausgehend von L-Serin erhalten. Das in Abb. 3-14 gezeigte  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der Verbindung belegt die hohe Reinheit des Präparates. In der Vergrößerung sind bei 5.34 und 5.75 ppm ausschließlich die Signale der Olefin-Protonen des erwünschten *E*-Isomers **42** zu erkennen. Erwähnenswert ist auch das Auftreten zweier Dublett-Signale der Methylen-Protonen der MOM-Gruppe aufgrund von Diastereotopizität, die zusätzlich einen merklichen Dach-Effekt zeigen. Zusätzliche Signale anderer Diastereomere werden nicht beobachtet.

### 3-1-4 | Knüpfung des Phosphodiesters

Zur Knüpfung des asymmetrischen Phosphodiesters des angestrebten Sphingomyelin-Analogons wurden verschiedene Strategien erprobt. Diese Synthesen sind in Abb. 3-15 schematisch dargestellt.

Nachdem  $\text{POCl}_3$ -basierte direkte Veresterungen nicht zum Ziel führten, wurde zunächst auf die im semibiosynthetischen Ansatz A erfolgreich verwendete *H*-Phosphonat-Chemie zurückgegriffen. Dazu sollte ein in Anlehnung an Literaturvorschriften<sup>[143]</sup> gewonnenes Ceramid **44** zunächst in die korrespondierende *H*-Phosphonsäure **45** überführt werden und diese im Anschluss mit dem Cholin-Präkursor **12** zu **46** kondensiert werden. Beide Reaktionen ergaben das jeweilige Produkt in guten Ausbeuten. Interessanterweise erfolgten beide aufeinanderfolgenden Schritte unter Verwendung von NPCl (2-Chlor-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxid).<sup>[91]</sup> Im Gegensatz zu anderen Methoden zur Darstellung von *H*-Phosphonsäuren wie Phosphortrichlorid/Imidazol oder Salicylchlorophosphit (2-Chloro-1,3,2-benzodioxaphosphorin-4-on) zeichnet dieses Reagenz sich dadurch aus, dass es ein leicht handhabbarer, wenig hydrolyseempfindlicher Feststoff ist. Zudem kann es auch anstelle von Pivaloylchlorid zur anschließenden Aktivierung der *H*-Phosphonsäure dienen. Das dabei vermutlich gebildete intermediäre gemischte Phosphonsäureanhydrid reagiert mit einem zugegebenen Alkohol zum *H*-Phosphonsäurediester.<sup>[91]</sup> Zur Oxidation dieses hydrolyseempfindlichen Zwischenprodukts wurde Tetrabutylammoniumperiodat verwendet, das in Vorversuchen zur Kupplung der Testverbindung Oleyl-*H*-phosphonat überzeugende Resultate ergeben hatte.

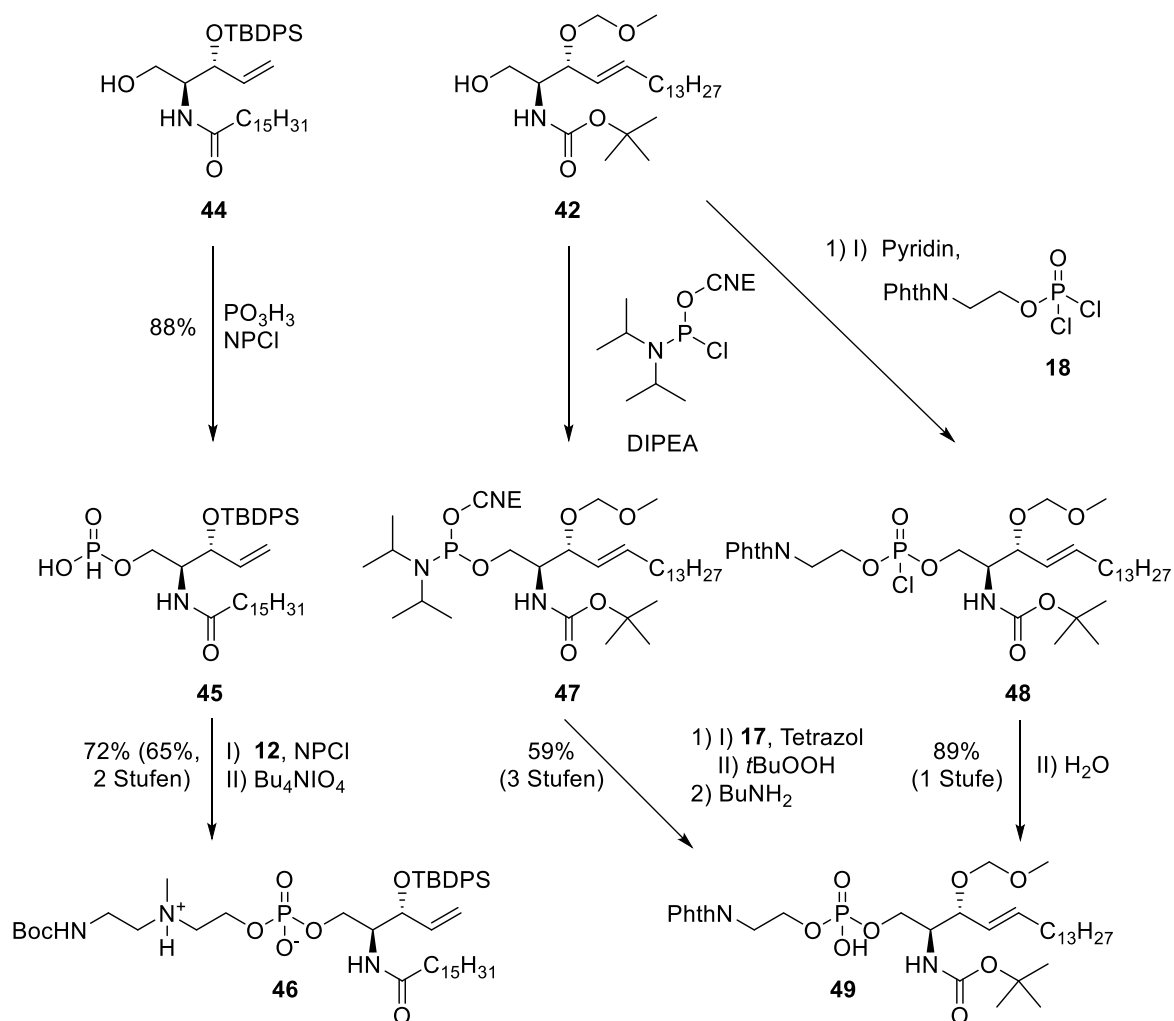


Abb. 3-15 | Schema zur Synthese maskierter Sphingomyelin-Präkursoren | von links nach rechts: Darstellung mittels *H*-Phosphonat-, Phosphoramidit- oder Phosphorodichloridat-Methode, DIPEA = Diisopropylethylamin, NPCl = 2-Chlor-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxid, Phth = *ortho*-Phthaloyl-.

Mittels Olefinmetathese sollte die so isolierte Verbindung **46** anschließend unter Verwendung entsprechender Alkene im Sphingosin-Rückgrat fluoreszent markiert werden. Der Phosphodiester **46** erwies sich dabei jedoch als nahezu inert. Vermutlich führte das vorhandene tertiäre Amin zur Desaktivierung des Ruthenium-Katalysators. Dieser Effekt wurde auch durch NUSSBAUMER *et al.* bei Versuchen zum *scrambling* von Sphingolipiden mit NBD-markierten Olefinen beobachtet.<sup>[79]</sup> Zwar gelang die Markierung von Sphingomyelin in 5% Ausbeute, Sphingosin jedoch lieferte überhaupt kein Produkt und *N,N*-Dimethylsphingosin nur nach Protonierung (die im Fall von **46** nicht mit den vorhandenen Schutzgruppen kompatibel ist). Um auszuschließen, dass nur die geringe Löslichkeit der Edukte eine effektive Metathese verhindert, wurde die Reaktion in einem System aus Detergenz-haltigem, entgastem Wasser wiederholt, jedoch wurden auch so nur Spuren des angestrebten Produkts gebildet. Der Plan, einen Fluorophor im



Sphingosin-Rückgrat zu platzieren, wurde daraufhin endgültig verworfen. Infolgedessen wurde die eingangs (Seite 48 und folgende) bereits erläuterte Alternativstrategie entwickelt. In diesem Kontext sollten das im Kapitel 3-1-3 vorgestellte Sphingosin **42** und die NBD-markierten Phosphocholin-Derivate oder -Präkursoren aus Kapitel 3-1-1 über einen Phosphodiester verknüpft werden. Versuche zur Phosphodiester-Synthese mittels *H*-Phosphonat-Methode unter Verwendung NBD-markierter Kopfgruppen-Analoga verliefen unbefriedigend. Die zur Kupplung erforderlichen oxidativen Bedingungen erwiesen sich als offenbar inkompatibel mit den vorhandenen funktionellen Gruppen der Nitrobenzoxadiazolylamin-Derivate. Dies äußerte sich in der Bildung schwer zu trennender Stoffgemische und allgemein ungenügenden Ausbeuten. Darum wurde zur Verwendung Phosphoramidit-basierter Kupplungsreagenzien gewechselt, die LANKALAPALLI *et al.* im Jahre 2009 zur Synthese photoaktivierbarer Analoga von Ceramid-1-phosphat einsetzten.<sup>[157]</sup> Wie in Abb. 3-15 gezeigt, erwies sich das Reagenz 2-Cyanoethyl-*N,N*-diisopropylchlorophosphoramidit in Kombination mit dem Phthalimid-maskierten Aminoethanol-Derivat **17** als tauglich zum Aufbau der gewünschten Verbindung **49**. Da ihre Verwendung aber ebenfalls mild oxidative Reaktionsbedingungen erfordert und nicht zuletzt mit erheblichen Kosten verbunden ist, wurde parallel ein geschütztes Phosphorodichloridat **18** erprobt, welches bislang nur in wenigen Fällen zur Darstellung von Kephallinen Verwendung fand.<sup>[90]</sup> Es erwies sich als Glücksgriff, denn **18** ist in zwei Schritten aus günstigen Ausgangsverbindungen ohne Notwendigkeit einer Chromatographie erhältlich. Seine Verwendung verringerte zusätzlich die Anzahl der notwendigen linearen Syntheseschritte um zwei Stufen und verbesserte die Ausbeuten von 59 auf 89%. Mit der erfolgreichen Synthese des Phosphodiesters **49** konnte nun die abschließende Anbringung der Fluorophore erfolgen.

### 3-1-5 | Installation der Fluorophore

Nachdem die im vorangegangenen Abschnitt geschilderten Hürden zur Knüpfung des asymmetrischen Phosphodiesters erfolgreich überwunden wurden, schlossen sich relativ einfache Schritte zur finalen Darstellung der geplanten Sonde an.

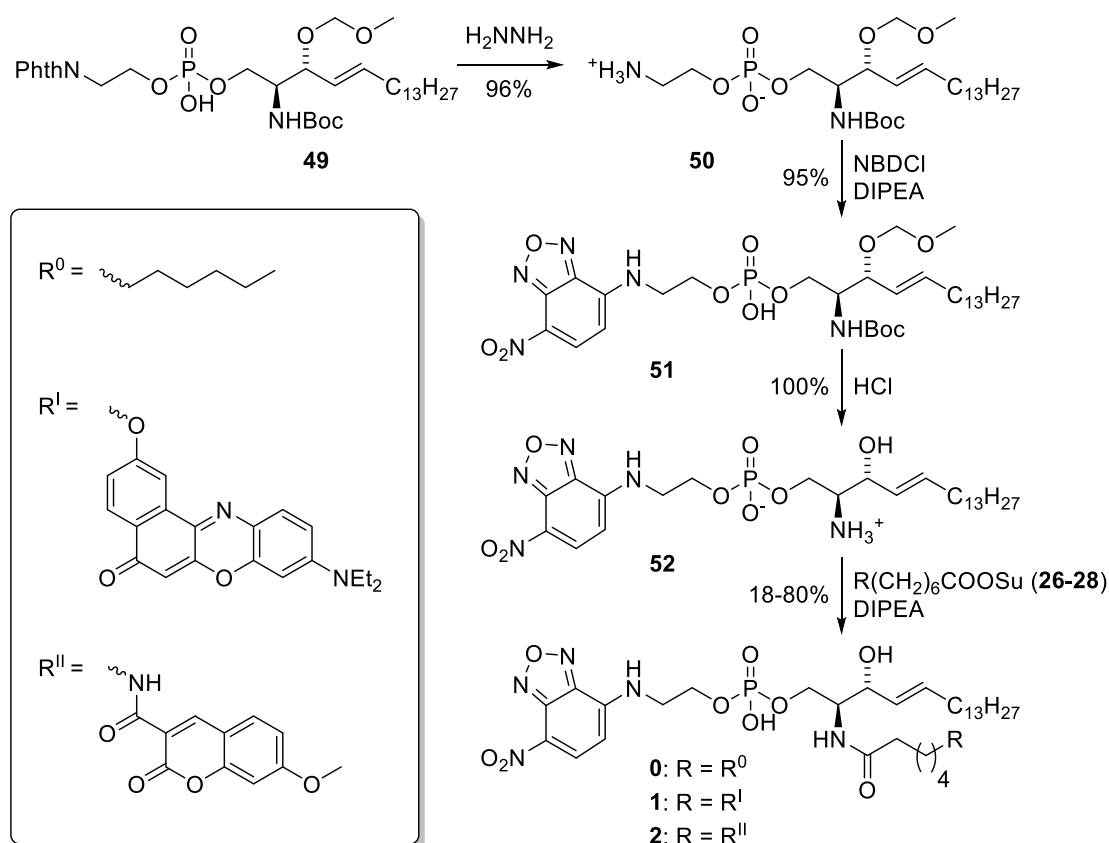


Abb. 3-16 | Syntheschema der finalen Installation der Fettsäuren zur Darstellung der angestrebten fluoreszent markierten Sphingomyelin-Analoga.

Wie in Abb. 3-16 gezeigt, lieferten die Hydrazinolyse des Phthalimids **49** nach der ING-MANSKE-Methode<sup>[158]</sup> und die Einführung des NBD-Fluorophors nach Standardmethoden<sup>[119]</sup> die Produkte **50** und **51** in sehr hohen Ausbeuten >95%. Aufgrund des anionischen Charakters der generierten Phosphodiester erwies sich ihre Aufreinigung als anspruchsvoll, aber möglich unter Verwendung eines ternären Gemisches aus Chloroform, Methanol und Wasser. Auf diesem Wege wurde das zentrale Intermediat **51** in einer Ausbeute von 22% über elf lineare Stufen erhalten. Nach globaler Entfernung der Schutzgruppen von **51** wurde das Produkt **52** in einem letzten Schritt mit verschiedenen unter STEGLICH-Bedingungen aktivierten, fluoreszent markierten Hexansäuren oder unmodifizierter Laurinsäure zur Reaktion gebracht, um fluoreszent markierte Sphingomyelin-Analoga zu erhalten. So wurde die einfach NBD-markierte Sonde **0**, sowie die zweifach markierten Sonden **1** und **2** in 4-17% Ausbeute über 13 lineare Stufen erhalten, was einer mittleren Ausbeute von 78-87% je Stufe entspricht.

### 3-2 | Synthese von Referenzsubstanzen

Zur Gewinnung synthetischer Standards für die vergleichende Analyse der beim enzymatischen Abbau der ASM-Sonden **1** und **2** hypothetisch gebildeten fluoreszierenden Reaktionsprodukte (Phosphorylcholin- und Ceramid-Analoga) wurde der Synthesepfad entsprechend modifiziert.

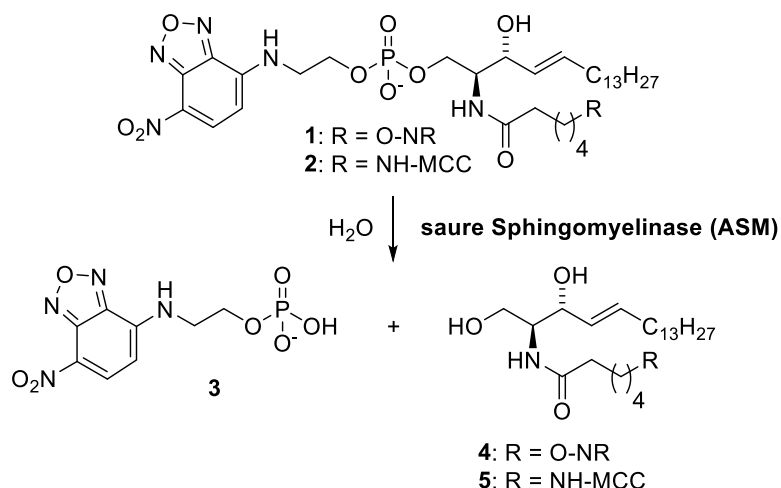


Abb. 3-17 | Hypothetische Bildung fluoreszierender Reaktionsprodukte bei ASM-katalysierter Hydrolyse der potentiellen ASM-Sonden **1** und **2** | Zum Vergleich wurden wie in diesem Abschnitt beschrieben synthetische Standards der Verbindungen dargestellt.

Die große Ähnlichkeit der erforderlichen Intermediate und Transformationen erlaubte eine starke Anlehnung an die bereits etablierten Reaktionsschritte. Unter Beibehaltung der Schutzgruppenstrategie musste lediglich die Bildung des Phosphodiesters vor Installation der Fettsäure-Derivate ausgelassen werden, wodurch auch die vielen beschriebenen Nachteile der Handhabung von Phosphodiestern wegfielen und Standard-aufreinigungsmethoden zur Anwendung kommen konnten. Die folgende Abbildung zeigt die Synthese der Ceramid-Derivate.

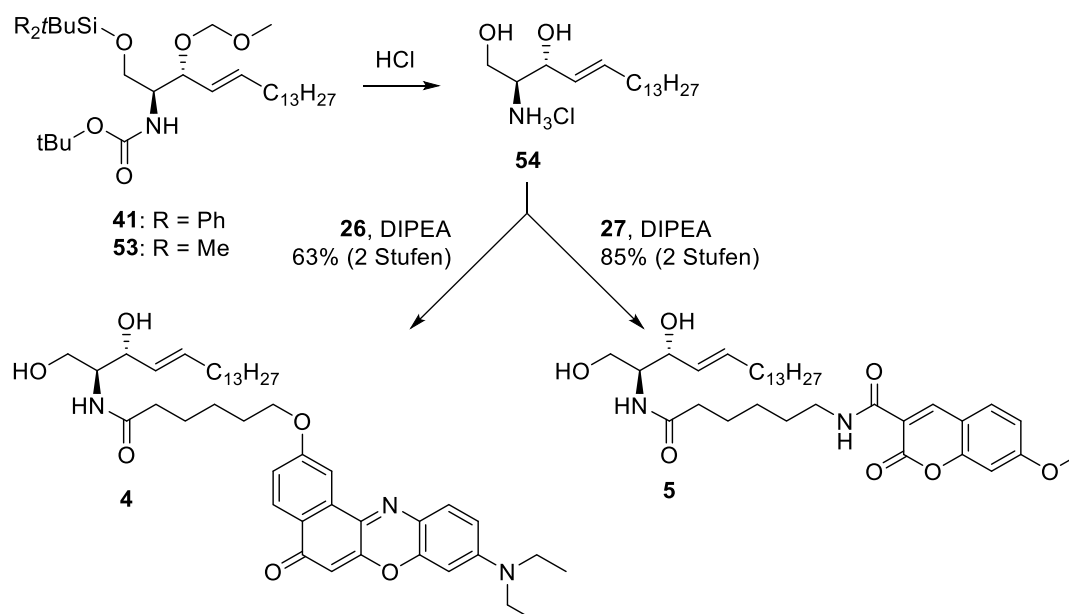


Abb. 3-18 | Synthese des NR- bzw. MCC-markierten Ceramid-Derivats **4** bzw. **5**.

Ausgehend vom geschützten Sphingosin **41**, das schon zur Synthese der Sonden verwendet worden war, oder seines auf ähnlichem Wege dargestellten Pendants **53**, wurde das nach saurer Hydrolyse der Schutzgruppen erhaltene Sphingosin **54** direkt weiter mit den in Kapitel 3-1-2 vorgestellten Aktivestern **26** und **27** umgesetzt. So konnten NR-Cer **4** und MCC-Cer **5** in guten Ausbeuten von 63% bzw. 85% (bezogen auf **41** bzw. **53**) gewonnen werden.

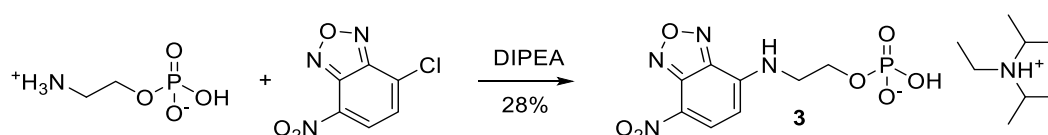


Abb. 3-19 | Synthese der Referenzverbindung **3**, einem der Fragmente der angestrebten ASM-Sonde.

Zu Vergleichszwecken wurde daneben auch das NBD-haltige Fragment **3** (Abb. 3-18) vollsynthetisch dargestellt, welches bei der ASM-vermittelten Hydrolyse der dargestellten Sonden **0**, **1** und **2** hypothetischerweise gebildet werden würde. Dazu wurde das kommerzielle 2-Aminoethylphosphat mit NBDCl zur Reaktion gebracht. Aufgrund der geringen Löslichkeit in Methanol verlief die Reaktion verhältnismäßig langsam. Zudem erschwerte der salzartige Charakter des Produkts die Abtrennung der Verbindung. Sie gelang mittels RP-Chromatographie mit einer mobilen Phase von 5% Acetonitril in Wasser. Nach Einengung der produkthaltigen Fraktionen wurde das gewünschte Molekül in Form seines DIPEA-Salzes in moderater Ausbeute von 28% isoliert.

### 3-3 | Absorptionsspektroskopie

Zur Charakterisierung der dargestellten fluoreszierenden Ceramid- und Sphingomyelin-Analoga wurden zunächst mittels Absorptionsspektroskopie die Wellenlängen ihrer Absorptionsmaxima  $\lambda_{max}$ , sowie ihren dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_\lambda$  ermittelt wie im Experimentellen Teil beschrieben. Als Medium diente ein Detergenzhaltiger saurer Acetatpuffer (pH 5.0), welcher bereits in vorhergehenden Arbeiten zur radiometrischen ASM-Aktivitätsbestimmung verwendet wurde.<sup>[22,159]</sup> Die berechneten stofflichen Kenngrößen und die Parameter der linearen Regression fasst Tab. 3-1 am Ende dieses Abschnitts zusammen.

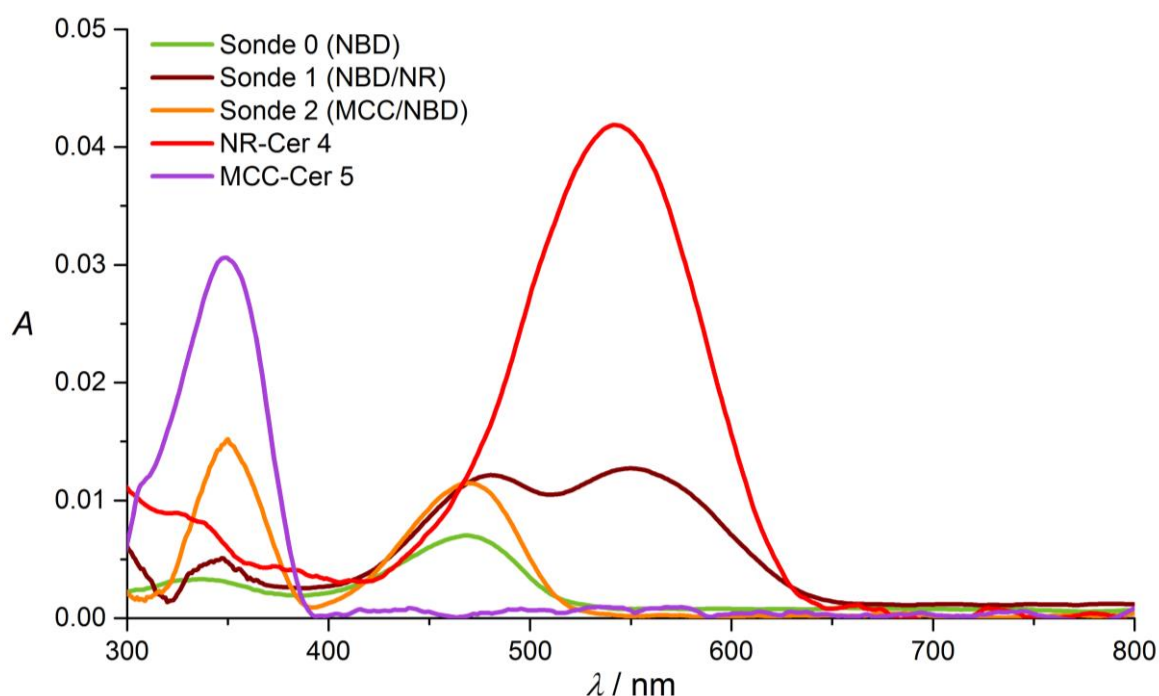


Abb. 3-20 | Absorptionsspektren der dargestellten fluoreszierenden Ceramid- & Sphingomyelin-Analoga |  $c = 1 \mu\text{M}$ , Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1% TX-100, Schichtdicke  $d = 1 \text{ cm}$ , MCC = 7-Methoxycumarin-3-carboxylat-, NBD = 7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-, NR = 9-Diethylamino-5-oxo-5H-benzo[a]-phenoxazin-2-yl-.

Die gefundenen Maxima  $\lambda_{max}$  (siehe Abb. 3-20) entsprechen der Absorption durch MCC (~350 nm), NBD (~470 nm) und NR (~550 nm) und liegen im Bereich der Literaturwerte.<sup>[114,118,143]</sup> Während die einfach markierten Ceramide (**4**, **5**) im betrachteten Spektralbereich nur jeweils ein intensives Absorptionsmaximum aufwiesen, zeigten sich wie erwartet mehrere für Sonde **1** und **2**, die auf die zugrundeliegenden beiden Fluorophore zurückgeführt werden können. Beim Vergleich der Sonden **1** und **2** fällt die annähernd gleiche Absorbanz  $A$  der verschiedenen Chromophore auf (siehe auch

Abb. 3-21, braune und orangefarbene Graphen). Dies gilt sowohl für die Chromophore innerhalb desselben Moleküls als auch im Vergleich zwischen den beiden Sonden. Deutlich verschieden ist dagegen die Trennung der Absorptionsbanden; Sonde **2** verfügt über annähernd Basislinien-getrennte Banden der beiden inkorporierten Chromophore, während in Sonde **1** die Absorbanz zwischen den beiden Höchstwerten nie unter 80% des Maximalwertes absinkt. Obwohl nur einfach markiert, zeigt auch Sonde **0** zwei Maxima. Neben dem intensiven bei  $\sim 470$  nm findet sich ein weiteres lokales Maximum um 330 nm von deutlich geringerer Intensität, welche beide auf den NBD-Chromophor zurückgehen.

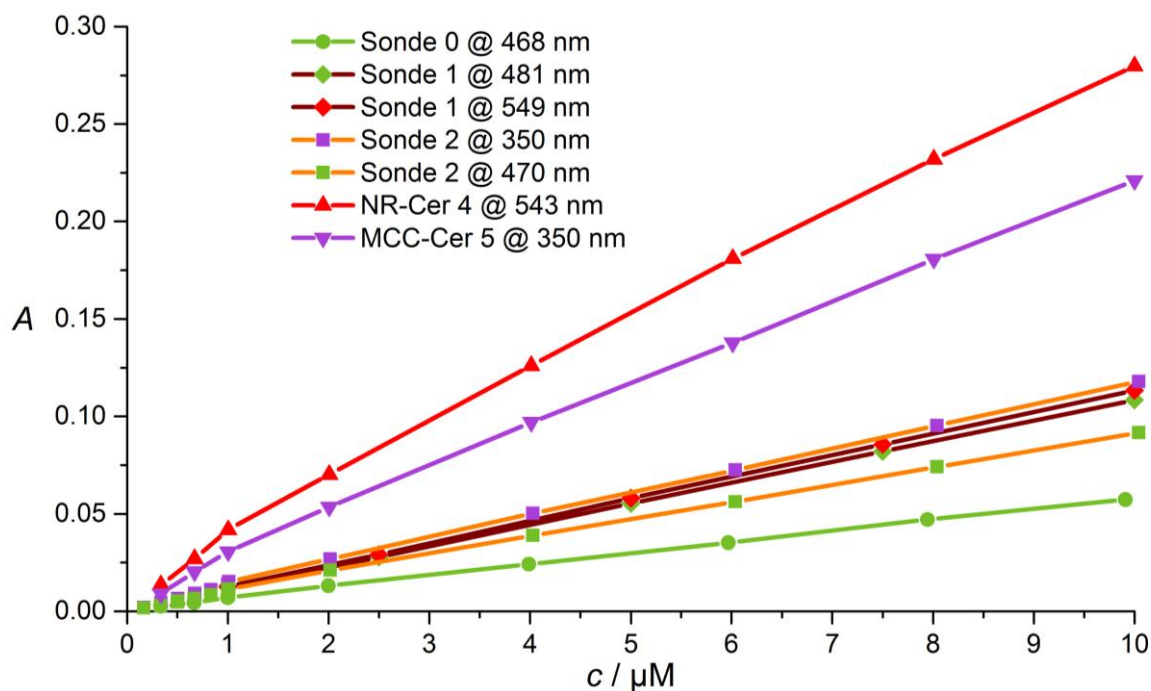


Abb. 3-21 | Konzentrationsabhängigkeit der Absorbanz der dargestellten fluoreszierenden Ceramid- & Sphingomyelin-Analoga an ausgewählten Absorptionsmaxima | Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100, Schichtdicke  $d = 1$  cm.

Die Konzentrationsabhängigkeit der Absorbanz  $A$  der Verbindungen wurde bis zu einer maximalen Konzentration von  $c = 10 \mu\text{M}$  gemessen (Abb. 3-21). Um Probe zu sparen, wurde auf eine darüberhinausgehende Messung verzichtet und nur der erwartete Arbeitskonzentrationsbereich abgedeckt. Um innere Filtereffekte in den folgenden Experimenten (Kapitel 3-4 und folgende) zu minimieren, wurde eine Konzentration von  $1 \mu\text{M}$  gewählt, sodass die Absorbanz stets  $<0.05$  bleibt. Die zugrundeliegenden Einzelspektren sind mit einheitlichem Maßstab im Anhang abgebildet (Abb. 9-7 bis Abb. 9-11). Die Messungen zeigten einen linearen Anstieg der Absorbanz mit der Probenkonzentration. Die hohe Proportionalität wurde durch lineare Regression der Messwerte an den ermittelten Maxima mit einem Bestimmtheitsmaß  $R^2$  von jeweils  $>0.99$  bestätigt

(siehe Tab. 3-1). Geringe Abweichungen vom linearen Zusammenhang beruhen möglicherweise auf Aggregationsphänomenen (siehe Kapitel 3-6-2). Streuungseffekte und apparative Limitierungen sind mutmaßlich die Ursache dafür, dass einige Regressionsgeraden den Koordinatenursprung nicht exakt schneiden. Die aus den Anstiegen der Regressionsgeraden ermittelten dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_\lambda$  sind mit  $6000\text{--}27000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$  im mittleren Wertebereich angesiedelt. Die Werte der NBD-Banden liegen deutlich unter den Literaturwerten für NBD-markiertes *n*-Propylamin in Wasser ( $28000\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ ), jedoch nicht in Cyclohexan ( $11500\text{ cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$ ),<sup>[105]</sup> was ein Indiz für eine deutlich unpolare Umgebung des Chromophors und einen vergleichsweise geringen Gesamt-*decay* seines angeregten Zustands ist. Es fällt auf, dass NR und MCC in den Ceramiden (**4**, **5**) deutlich größere Absorbanz aufweisen als dieselben Chromophore in den Sphingomyelin-Analoga (**1**, **2**), unabhängig davon, ob der Chromophor dort möglicher FRET-Donor oder -akzeptor ist.

Tab. 3-1 | Zusammenfassung der Ergebnisse der Absorptionsspektroskopie und Zuordnung der Absorptionsmaxima  $\lambda_{\max}$  zu den enthaltenen Chromophoren | dekadischer molarer Extinktionskoeffizient  $\epsilon_\lambda = m \cdot d^{-1}$ , lineare Regression  $f(x) = mx + f(0)$ , deren angepasstes Bestimmtheitsmaß  $R^2$ , Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100, Schichtdicke  $d = 1\text{ cm}$ .

$c = 1\text{ }\mu\text{M}$	$\lambda_{\max} / \text{nm}$	Zuordnung	$f(0)$	$m / \mu\text{M}^{-1}$	$R^2$	$\epsilon_\lambda / \text{cm}^{-1}\text{ M}^{-1}$
Sonde <b>0</b>	468	NBD	0.00114	0.00572	0.999	5720
Sonde <b>1</b>	481	NBD	0.00139	0.01072	0.999	10720
Sonde <b>1</b>	549	NR	0.00149	0.01121	0.999	11210
Sonde <b>2</b>	350	MCC	0.00158	0.01169	0.999	11690
Sonde <b>2</b>	470	NBD	0.00099	0.00912	0.999	9120
NR-Cer <b>4</b>	543	NR	0.01167	0.02739	0.997	27390
MCC-Cer <b>5</b>	350	MCC	0.00702	0.02164	0.998	21640

### 3-4 | Fluoreszenzspektroskopie

Um die Eignung der dargestellten Sphingomyelin-Analoga als FRET-Sonden der sauren Sphingomyelinase (ASM) zu untersuchen, wurden die dargestellten Verbindungen unter Verwendung der ermittelten Anregungswellenlängen auf ihre Fluoreszenzeigenschaften untersucht. Zu diesem Zwecke wurden sie in DMSO gelöst, mit ASM-Puffer auf  $1\text{ }\mu\text{M}$  verdünnt und Fluoreszenzanregungs- und Fluoreszenzemissionsspektren aufgenommen. Um die Eignung der Sphingomyelin-Analoga zur Bestimmung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase in einem homogenen Assay zu untersuchen, wurde zudem die zeitliche Veränderung der Spektren bei Zugabe von rekombinanter humaner ASM studiert.

### 3-4-1 | ASM-Sonde der ersten Generation

Zunächst wurden die Fluoreszenzeigenschaften von Sonde **1** charakterisiert (Abb. 3-22, durchgezogene Kurven). Das Fluoreszenzanregungsspektrum zeigt eindeutig zwei Banden (480 und 550 nm), deren Anregung zu Fluoreszenz der Sonde **1** um 624 nm führt. Diese stimmen mit den mittels Absorptionsspektroskopie ermittelten Absorptionsbanden 430-480 nm bzw. 530-580 nm überein (siehe Kapitel 3-3). Die getrennte Anregung dieser Banden lieferte in beiden Fällen ausschließlich Fluoreszenz um 624 nm, die eindeutig dem NR-Chromophor zugerechnet werden kann und auch in früheren Arbeiten bei etwa 620 nm beobachtet wurde.<sup>[135,143]</sup> Es wurde keine zweite Fluoreszenzbande um 540 nm beobachtet, die auf eine gleichzeitige Emission durch das NBD-Chromophor schließen ließe. Dies belegt sehr effizienten FRET des Konstrukts, welches sich infolgedessen wie ein einzelnes Fluorophor mit zwei Anregungswellenlängen verhält. Ein Vergleich mit Spektren des zugrundeliegenden Ceramids **4** (siehe Abb. 3-23) zeigt zwar ein identisches Emissionsmaximum bei 620 nm, jedoch nur ein Absorptionsmaximum bei 545 nm ohne Schulter. Der Fakt, dass für **1** eine zusätzliche Bande um 480 nm detektiert wird, beruht auf FRET von NBD zu NR.

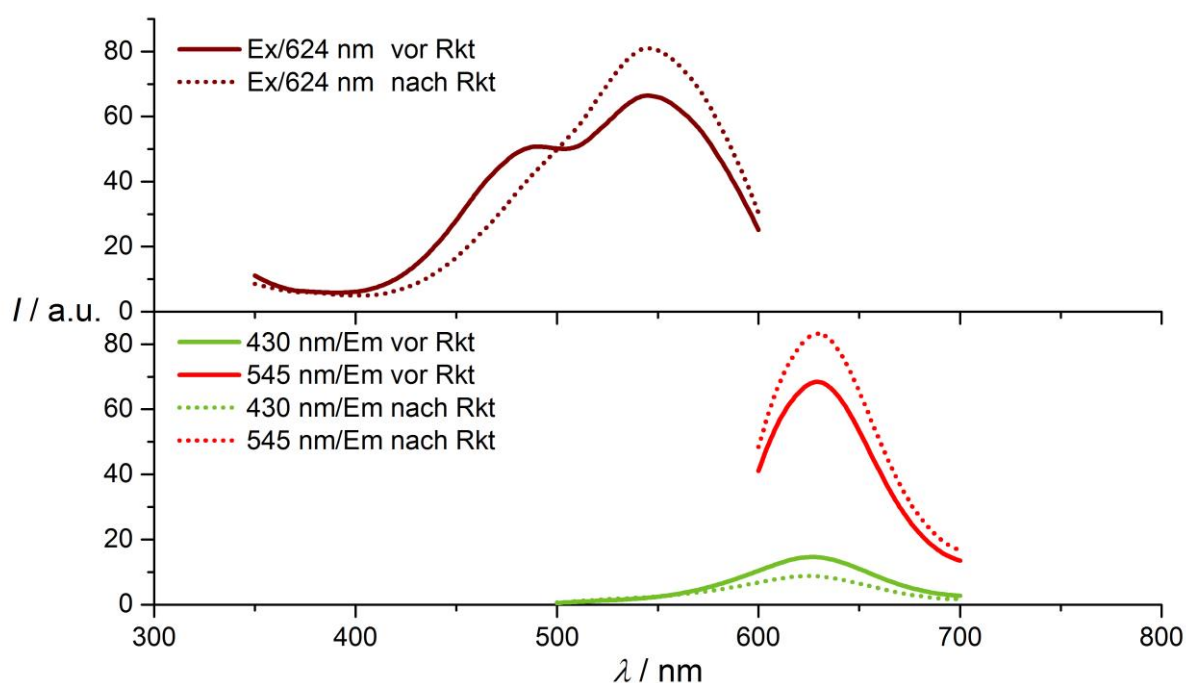


Abb. 3-22 | Fluoreszenzanregungs- (oben) und Fluoreszenzemissionsspektren (unten) der Sonde **1** vor (—) und nach (···) der Reaktion mit ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ) |  $t = 180 \text{ min}$ , Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100, gemeinsame Darstellung im Spektrenanhang.



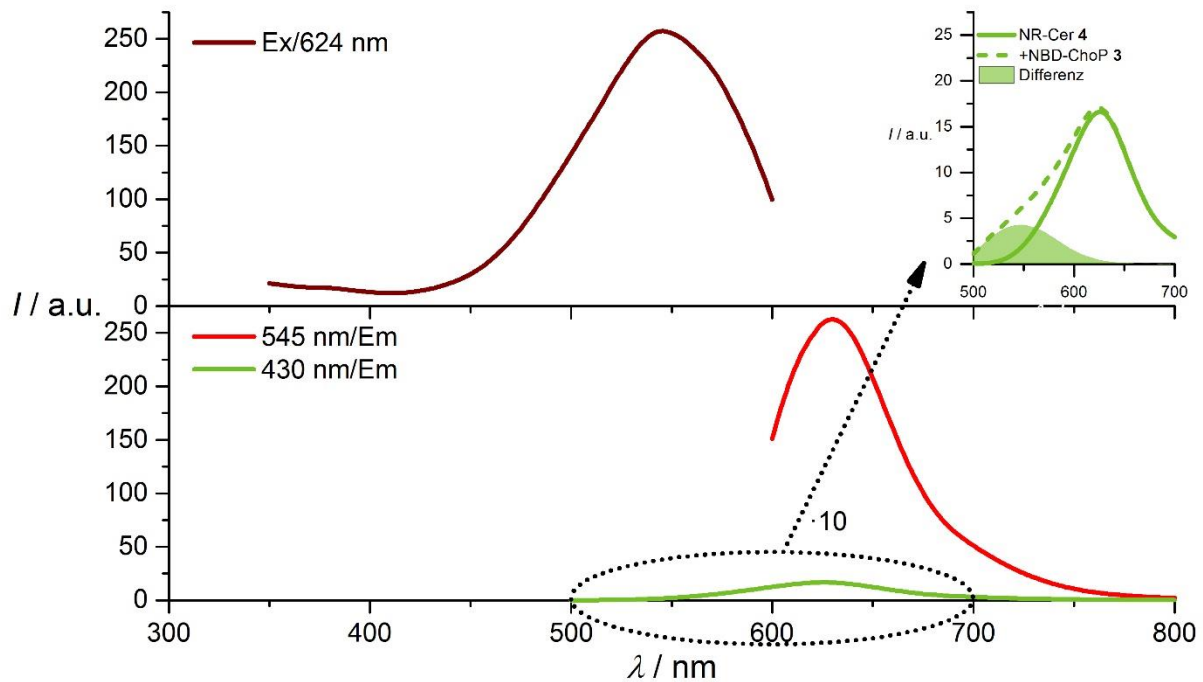


Abb. 3-23 | Fluoreszenzanregungs- (oben) und Fluoreszenzemissionsspektren (unten) von synthetischem NR-Cer **4**, dem hypothetischen Produkt der ASM-vermittelten Hydrolyse der Sonde **1** | Einsatz: Vergrößerung der 430 nm Emissionsspektren von NR-Cer **4** vor (—) und nach (---) Zugabe des zweiten hypothetischen Fragments NBD-ChoP **3**, sowie berechneter Beitrag des letzteren, beide  $c = 1 \mu\text{M}$ , Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1% TX-100, vollständiger Spektrensatz des Gemischs im Spektrenanhang.

Die Situation ändert sich bei Zugabe rekombinanter humaner saurer Sphingomyelinase (ASM). Etwa 90 Minuten nach Zugabe des Enzyms stellt sich ein statischer Zustand ein (Abb. 3-22, punktierte Kurven), der neben Intensitätsveränderungen besonders durch das Verschwinden der dem FRET zugeschriebenen Bande gekennzeichnet ist. Folglich scheint Verbindung **1** eine FRET-Sonde der ASM zu sein. Die Aufnahme von Emissionsspektren in Zeitintervallen erlaubte die Verfolgung der Reaktion der Sonde **1** bei Zugabe von ASM durch die zeitabhängige Änderung des Fluoreszenzspektrums (Abb. 3-24). Dabei zeigte sich eine graduelle Abnahme der NR-Fluoreszenz um max. 50%. Die Fluoreszenz von NBD stieg währenddessen jedoch nur marginal an. Aus der Veränderung der Signalintensitäten wurde ein vergleichsweise niedriger<sup>[135,143]</sup> RC von 2.6 kalkuliert. Um die Ursachen aufzuklären, wurde das hypothetische Produktgemisch aus den eigens zu diesem Zwecke dargestellten synthetischen Komponenten NBD-Aminoethylphosphat **3** (NBD-ChoP) und NR-Ceramid **4** (NR-Cer) nachgestellt und vermessen (Abb. 3-23), wobei ebenfalls ein kaum messbarer Anstieg der NBD-Emission bei Zugabe des letzteren beobachtet wurde.

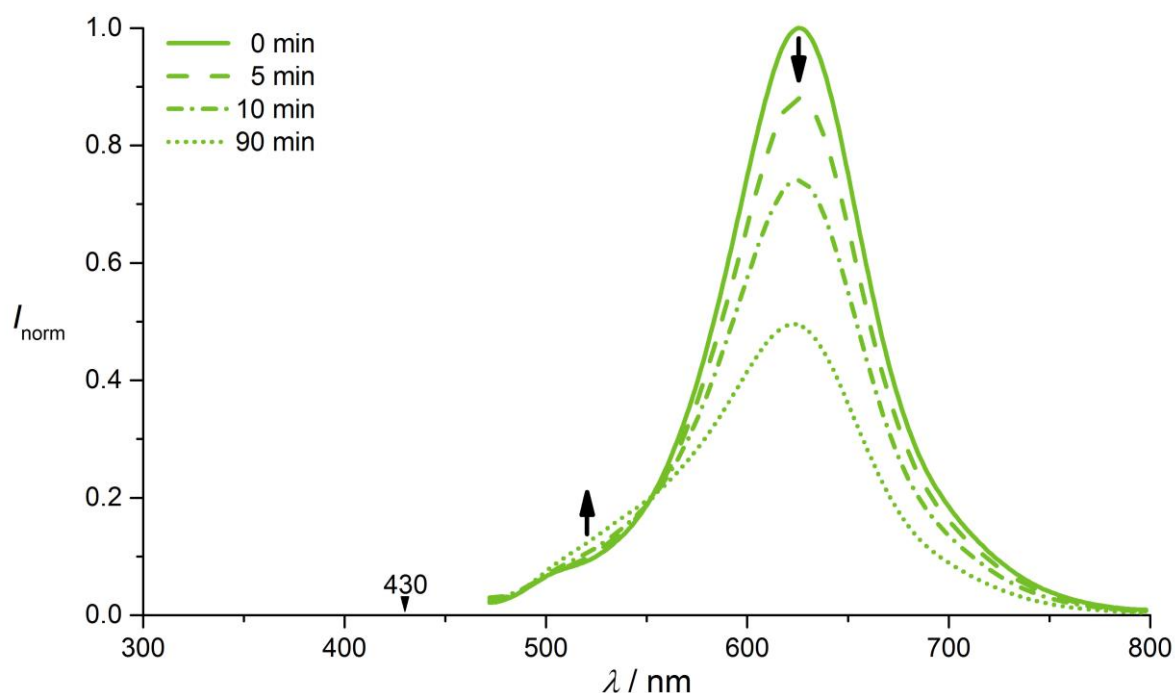


Abb. 3-24 | Zeitliche Änderung des Fluoreszenzemissionsspektrums der Sonde **1** nach Zugabe von rek. humaner ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ) | Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1% TX-100, Anregung: 430 nm, normiert auf den Startwert.

Auffällig an den Spektren ist, dass die direkte Anregung des Akzeptors (NR) eine deutlich intensivere Emission zeitigt, als die Anregung des Donors, obwohl dieser kaum selbst fluoresziert. Dies ist ein Hinweis auf verstärkte Löschung des Donors, die in der intakten Sonde **1** in Konkurrenz zum FRET-Prozess steht. Zusätzlich erschwert die unzulängliche Trennung der Anregungsbanden die Unterscheidung zwischen tatsächlichem FRET und direkter Anregung des Akzeptors. Die starke Überlappung der beiden Banden verhindert eine selektive Anregung des NBD-Fluorophors. Durch die Wahl einer kleineren Wellenlänge als der des Maximums (430 nm), wurde versucht, eine bestmögliche Selektivität zu erzielen, was mit einer deutlich verminderten Intensität der Emission einherging. Die Anregungsbande des NR-Chromophors ist allerdings derartig breit, dass selbst bei 430 nm, also über 100 nm vom Anregungsmaximum entfernt, noch Anregung auftritt, die in der gleichen Größenordnung liegt wie der Beitrag des FRET. Ebenfalls interessant ist, dass die Fluoreszenzintensität des Akzeptors (Abb. 3-22, roter Graph) nach Hydrolyse des Konstrukts **1** durch Inkubation mit ASM sogar noch über den Startwert ansteigt. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte eine verminderte Fluoreszenzlöschung des gebildeten NR-Ceramids im Vergleich zur intakten Sonde **1** sein.

Nach dem Erreichen des Endzustandes (gekennzeichnet durch das Ausbleiben weiterer Änderungen des Spektrums selbst bei Zugabe weiterer ASM), wurden die Lipide wie von

FOLCH beschrieben<sup>[160]</sup> aus der Reaktionsmischung extrahiert und mittels DC und HPLC-MS untersucht. In der Reaktionsmischung konnte das Schnittprodukt NR-Ceramid durch Vergleich mit der synthetischen Referenz **4** eindeutig nachgewiesen werden. Damit bestätigte sich die antizipierte Phospholipase C-artige Hydrolyse des Konstrukts **1** zwischen dem Ceramid und dem Phosphat. Auf diese Weise gelang auch der Nachweis der Vollständigkeit der enzymatischen Hydrolyse. Somit schied eine unvollständige Reaktion als mögliche Ursache für den geringen *RC* aus. Ferner wurden Löslichkeitseffekte als weitere mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen; die Reaktionslösung erschien zu jedem Zeitpunkte makroskopisch homogen ohne Zeichen von Koagulation oder Ausfällungen. Wie geplant scheinen sich Sonde **1** und NR-Cer **4** spontan in die vorhandenen Mizellen einzulagern, wenn sie zu den Detergenz-haltigen Puffern gegeben werden, denn unter der Annahme, dass sich die hier verwendeten NR-Derivate spektroskopisch ähnlich zur Stammverbindung verhalten, zeigt die Lage des Absorptionsmaximums bei 543 nm und des Emissionsmaximums bei 624 nm beider Verbindungen, dass sich der NR-Fluorophor in beiden nicht in wässriger, sondern in einer relativ unpolaren Umgebung befindet.<sup>[120]</sup>

Trotz der vielversprechenden Teilergebnisse war die Empfindlichkeit der Detektion der ASM-Aktivität mit Sonde **1** mit einem *ratio change* von <3 unbefriedigend. Zwar gestattete sie die Verfolgung der durch ASM katalysierten Hydrolyse *in vitro*, jedoch lieferten mikroskopische Studien an HeLa-Zelllinien in Kooperation mit S. BANHART (ROBERT KOCH-INSTITUT, Berlin) keine belastbaren Daten bezüglich der angestrebten Verfolgung der Reaktion in der Zelle. Es zeigte sich, dass dies auf instrumentellen Einschränkungen (z.B. einer limitierten Auswahl von Anregungswellenlängen) in Kombination mit der unzureichenden spektralen Trennung zwischen Donor- und Akzeptoranregung der Sonde beruhte. Einziges Ergebnis dieser Versuche war, dass Sonde **1** und/oder ein NR-haltiges Produkt derselben (z.B. NR-Ceramid) sowohl aus mit Medium verdünnter DMSO-Lösung als auch aus 1:1 BSA-Komplexen in die Zellen aufgenommen werden.

### 3-4-2 | Konzept der phasentrennungsgestützten Signalverstärkung (PS)

Da die Antwort der ersten dargestellten ASM-Sonde **1** mit einem *ratio change* von <3 im Vergleich mit der Literatur<sup>[135,143]</sup> nicht zufriedenstellend war, galt es, die Ursachen zu analysieren und gezielt Sonden mit größerer Leistungsfähigkeit zu entwickeln. Ein Vergleich der spektroskopischen Eigenschaften von Sonde **1** mit denen der separat synthetisierten Schnittprodukte NBD-ChoP **3** und NR-Cer **4** offenbarte, dass die

Fluoreszenzintensität der verwendeten Fluorophore nicht nur von der Konzentration derselben abhängt. Um diesen Umstand zu studieren, wurde eine Arbeitshypothese entwickelt, nach der nicht nur die Menge der fluoreszierenden Spezies, sondern in besonderem Maße auch deren lokale Umgebung das Fluoreszenzsignal moduliert (phasentrennungsgestützte Signalverstärkung, *partition-aided signal amplification*, PS). Dieser zweite Faktor ist in homogener Lösung oder bei Verwendung einer inerten fluoreszierenden Verbindung meist vernachlässigbar, tritt in dem verwendeten mizellaren System jedoch ausgeprägt hervor. Im Lichte dieser Erkenntnisse können die Fluoreszenzeigenschaften (hier: Intensität) desselben Fluorophors an verschiedenen Ankermolekülen nicht als gleich angenommen werden, wenn die physikalischen Eigenschaften der Anker die Fluorophore in verschiedene Mikroumgebungen zwingen. Aus der geänderten Umgebung resultiert bei gleicher Konzentration ein mehr oder minder verändertes Signal, z.B. durch verstärkte Fluoreszenzlöschung oder Verschiebungen der Spektren durch die geänderte Lösungsmittelpolarität (siehe Kapitel 1-5-2). So zeigen NBD-markierte Lipide je nach Umgebung starke Änderungen der Quantenausbeute bei annähernd unveränderter STOKES-Verschiebung.<sup>[161]</sup> Im hier verwendeten ASM-kompatiblen Medium erzeugt das Vorhandensein eines Tensids zwei Phasen – Mizelle und wässrige Umgebung – mit sehr verschiedenen Eigenschaften (Polarität, Brechungsindex, Viskosität), die durch eine Grenzschicht getrennt sind. Bekanntermaßen springt der Wert der Permittivität des Mediums  $\epsilon_M$  beim Übergang von Wasser zum hydrophoben Kern einer Lipiddoppelschicht auf einer Distanz von etwa 1 nm abrupt von etwa 80 auf 2 F m<sup>-1</sup>, was meist nicht ohne Folgen für die Fluorophore in dieser Region bleibt (siehe dazu Kapitel 1-5-2, Gl. 1).<sup>[161]</sup> Durch die kovalente Anbindung des gleichen Fluorophors an hydrophobe, hydrophile oder amphiphile Anker kann dasselbe zum Aufenthalt in einer dieser Phasen gezwungen werden, wobei die unterschiedliche Umgebung in veränderten photophysikalischen Eigenschaften des Fluorophors resultiert. Die geschilderten Zusammenhänge erschweren naturgemäß die Beobachtung des FRET durch die Messung der Fluoreszenzintensitäten oder -lebensdauern. Mithin schien die absolute Quantifizierung der fluoreszierenden Spezies ohne genaue Kenntnis ihrer Mikroumgebung selbst im geschlossenen System der Küvette schwer realisierbar.

Auf der Grundlage der Arbeitshypothese wurden die an Sonde **1** gemachten Beobachtungen folgendermaßen interpretiert (siehe Abb. 3-25): Da die intakte Sonde ein zweischwänziges, geladenes Lipid ist, wird sie sich nicht frei im Medium bewegen, sondern besetzt die Oberfläche der darin vorhandenen Mizellen, sodass die unpolare Reste in das unpolare Innere der Mizellen ragen, während die polare Kopfgruppe in die polarere Grenzschicht ragt. Die kovalente Anbindung an das Lipid verhindert jedoch, dass die Kopfgruppe und der daran gebundene Fluorophor ganz in die wässrige Phase übergehen. Der Fluorophor im Inneren der Mizelle zeigt intensive Fluoreszenz wie in einem unpolaren Lösungsmittel, während der andere Fluorophor eine gewisse Fluoreszenzlöschung durch das ihn umgebende Wasser erfährt. Es findet FRET statt, allerdings ist das Reservoir angeregter Donormoleküle, aus dem er sich speist, weniger gefüllt. Die Situation ändert sich durch die von der zugegebenen ASM katalysierte Hydrolyse. Die in der Reaktion gebildete, hochpolare freie Kopfgruppe und der daran gebundene Fluorophor verlassen die Phasengrenze und gehen vollständig in die wässrige Phase über, wo die Fluoreszenz vom umliegenden Wasser fast vollständig gelöscht wird. Parallel wirkt auf das zweite gebildete Fragment der umgekehrte Effekt. Von der polaren Kopfgruppe befreit, migriert das unpolare Ceramid tendenziell tiefer in die Mizelle oder Membran, je nach vorheriger Position ist die Änderung der Umgebung des Fluorophors allerdings weit weniger ausgeprägt. FRET unterbleibt durch die räumliche Trennung der Fluorophore, welche durch die beschriebene Phasentrennung sogar noch verstärkt wird.

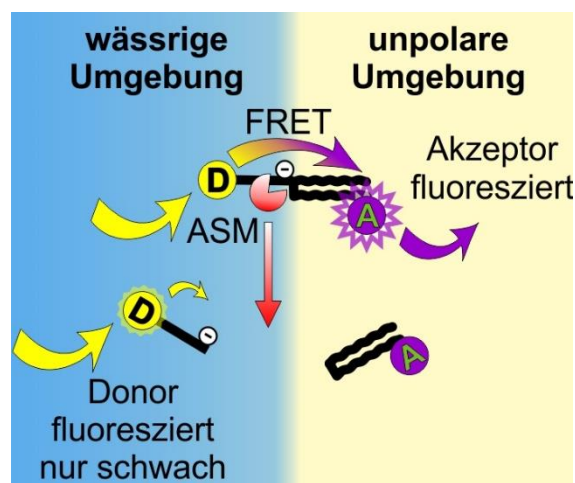


Abb. 3-25 | Schematische Darstellung des Konzepts der phasentrennungsgestützten Signalverstärkung (PS) einer FRET-Sonde am Beispiel der Verbindung **1** | Erläuterung im Text.

Auf die Sonde **1** bezogen, führen die erläuterten allgemeinen Zusammenhänge zu folgenden Effekten, die im Einklang mit den experimentellen Ergebnissen stehen:

a) Intakte Sonde 1:

- 1) Die intakte Sonde zeigt Fluoreszenz von NR (FRET-Akzeptor) im hydrophoben Molekülteil.
- 2) Die Intensität der Fluoreszenz von NBD (FRET-Donor) in der Kopfgruppe ist sehr schwach, da sowohl Fluoreszenzlöschung als auch FRET den angeregten Zustand entvölkern.
- 3) Der Beitrag von FRET zur Gesamtanregung des Akzeptors ist gering, weil das umgebende Wasser die Lebensdauer des angeregten Donors stark verringert.

b) Nach Trennung des Konstrukts durch die Einwirkung von ASM:

- 1) Die polare Kopfgruppe mit dem Donor geht in die wässrige Phase über, wo dessen Fluoreszenz fast vollständig gelöscht wird.
- 2) Aus verminderter Fluoreszenzlöschung des Akzeptors resultiert tendenziell ein Anstieg seiner Fluoreszenzintensität.
- 3) Die Fluoreszenz des Akzeptors sinkt durch den Wegfall des FRET.
- 4) Beide Umgebungseffekte (1 und 2) wirken gleichgerichtet und verringern im Ergebnis den *ratio change* der durch den verminderten FRET (3) hervorgerufen wird.

Um das PS-Konzept zu untermauern, diente die ausschließlich NBD-markierte Sonde **0** als Vergleich, die bei Inkubation mit ASM ebenfalls eine erhebliche Abnahme der Fluoreszenzintensität (-60%) zeigt, obwohl FRET hier ausgeschlossen werden kann (Abb. 3-26).

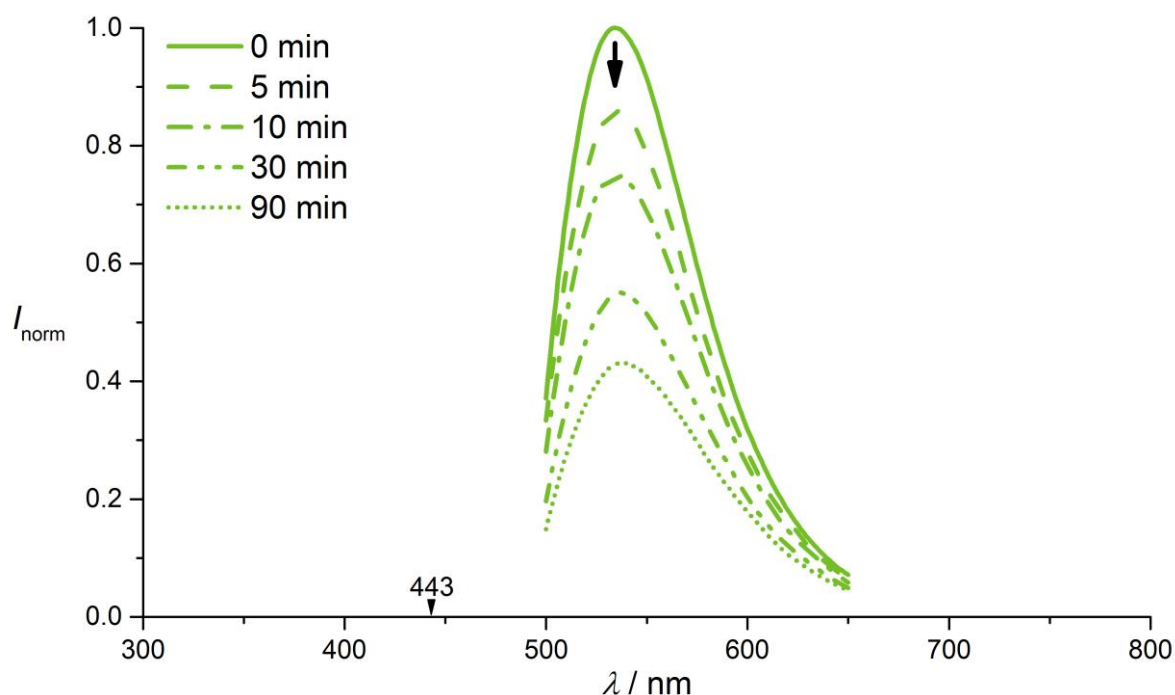


Abb. 3-26 | Zeitliche Änderung der Fluoreszenzemissionsspektren der Sonde **0** nach Zugabe von rek. humaner ASM ( $\beta = 5 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ) | Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100, Anregung: 443 nm, normiert auf den Startwert.

Bekanntermaßen ist der NBD-Fluorophor aufgrund seines *charge-transfer*-Charakters sehr sensibel bezüglich des umgebenden Lösungsmittels.<sup>[101,105]</sup> Diese Umgebungsempfindlichkeit zeichnet eine ganze Reihe Fluorophore aus, die aus diesem Grunde Anwendung als *polarity probes* zur Bestimmung der lokalen Polarität finden. Aus den geschilderten Beobachtungen wurde auf Grundlage der Arbeitshypothese gefolgert, dass die Vertauschung von Donor- und Akzeptor-Funktion im Sondenmolekül höchst vorteilhaft wäre: Im intakten Molekül würde der Anteil des FRET an der Fluoreszenz des Akzeptors nicht durch Fluoreszenzlöschung verfälscht und nach Hydrolyse das Restsignal des Akzeptors minimiert. Beide Effekte sollten so kumulativ zu einem amplifizierten *ratio change* führen. Die Zweckdienlichkeit der Restsignalunterdrückung wurde an Fluorescein bereits demonstriert.<sup>[134]</sup> Aufgrund der Wichtigkeit der Kopfgruppe des Sphingomyelin-Analogons für die Erkennung durch ASM sollte dieser Teil beibehalten werden, um nicht zu riskieren, dass die verbesserte Sonde zwar besseren FRET aufweist, aber kein Substrat des zu untersuchenden Enzyms mehr ist. Aufbauend auf Arbeiten von ZHANG *et al.*<sup>[140]</sup> wurde NR im unpolaren Teil des Moleküls durch 7-Methoxycumarin-3-carboxylat- (MCC) ersetzt und so NBD zum Akzeptor gemacht. Durch die Nutzung eines kommerziell verfügbaren MCC-Aktivesters konnte aus dem zentralen Intermediat **51** der vorangegangenen Synthese schnell eine neue Sonde generiert werden.

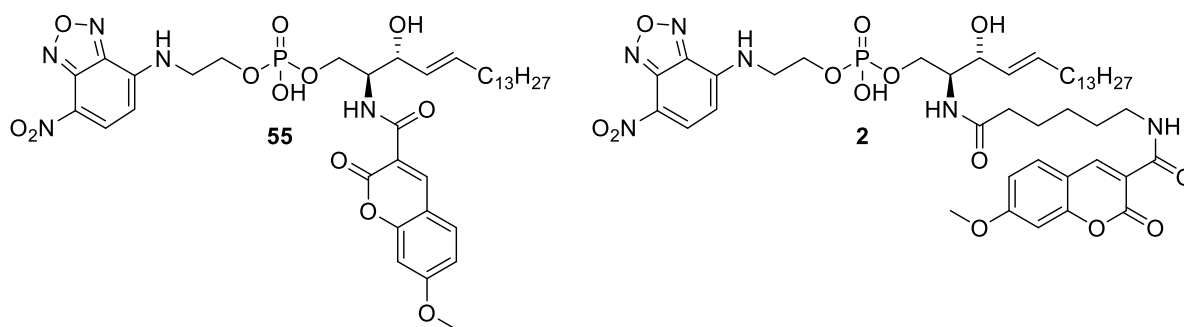


Abb. 3-27 | Strukturen der FRET-Systeme der zweiten Generation | Sie leiten sich ab von der ersten Generation **1**, durch Austausch von NR gegen MCC wurde aus NBD jedoch ein FRET-Akzeptor.

Die so zunächst dargestellte Verbindung **55** zeigte die gewünschten FRET-Eigenschaften, wurde jedoch nicht vom Enzym verstoffwechselt. Die Ursache wurde in der unnatürlichen aromatischen Amidbindung (siehe Abb. 3-27) vermutet, da diese nahe der zu hydrolysierenden Bindung liegt und durch die ungewöhnliche Rigidität des Cumarins möglicherweise die Interaktion mit der katalytischen Domäne der ASM verhindert. Deshalb wurde diese Sonde mit dem Abstandhalter 6-Aminohexansäure zwischen Cumarin und Sphingosin modifiziert (siehe Kapitel 3-1-5). Dadurch wurde eine funktionale zweite Generation der FRET-Sonde (Sonde **2**, siehe folgender Abschnitt) erhalten, die von ASM erkannt und geschnitten wird. Die Charakterisierung dieses Moleküls zeigte eine eindrucksvolle Steigerung der Leistungsfähigkeit um eineinhalb Größenordnungen. Wie erhofft, wurde ein ausgesprochen hoher *ratio change* von etwa 80 ermittelt. Die Synthese dieser verbesserten Sonde belegt die erfolgreiche Vorhersage der Verbesserung des *ratio change* der FRET-Sonde durch das hier zunächst als Arbeitshypothese vorgestellte PS-Konzept zur Amplifikation des FRET-Signals durch Umgebungseinflüsse. Es liefert eine plausible Erklärung für die verschiedenen Beobachtungen an drei Vertretern einer amphiphilen Stoffklasse. Da diese drei Vertreter sich jedoch weder in der Kopfgruppenmarkierung, noch im strukturellen Aufbau oder in der zur Trennung führenden Reaktion unterscheiden, bedarf es der Untersuchung weiterer, weniger verwandter Moleküle, um das Konzept weiter zu untermauern. Eine Übertragbarkeit des Konzepts auf andere mehrphasige Systeme scheint möglich. Die Weiterentwicklung dieses Konzepts ist nicht nur von akademischem Interesse, denn Signalamplifikation ist ein vielbearbeitetes Feld analytischer Disziplinen, die sich direkt in technischen Anwendungen wiederfinden. Auch nicht-lineare Verstärkungseffekte spielen zunehmend eine Rolle, wie beispielsweise *Surface-enhanced Raman spectroscopy* (SERS)-Techniken zeigen,



die das Signal eines Analyten in der Nähe geeigneter Oberflächen (z.B. Edelmetall-nanopartikel) verstärken.<sup>[162]</sup>

### 3-4-3 | ASM-Sonde der zweiten Generation

Wie in Abb. 3-28 dargestellt, zeigt Sonde **2** die für ein FRET-System typischen spektroskopischen Merkmale. So lässt sich das intakte Molekül (Abb. 3-28, durchgezogene Linien) bei zwei verschiedenen Wellenlängen (347 nm, 474 nm) zur Aussendung von Fluoreszenzlicht mit der für den Akzeptor typischen Wellenlänge (536 nm) anregen. Die Anregung bei 347 nm entspricht dabei der Anregung des Donors (MCC)<sup>[140]</sup> und anschließend FRET zum Akzeptor, die Bande bei 474 nm der direkten Anregung des Akzeptors (NBD).<sup>[135]</sup> Die Fluoreszenzemission des Donors (405 nm) ist sehr schwach, was darauf hinweist, dass sein elektronisch angeregter Zustand durch ausgeprägten FRET effektiv depopuliert wird. Ein weiteres Zeichen für sehr effektiven FRET ist die Tatsache, dass die Emission des Akzeptors in etwa gleich intensiv ist, unabhängig davon, ob er direkt oder mittels FRET angeregt wurde. Möglicherweise kompensiert eine im Vergleich mit dem Akzeptor NBD höhere Quantenausbeute des Cumarins die ohnehin geringen Verluste, die dem Fakt geschuldet sind, dass FRET ( $E < 1$ ) keinen quantitativen Transfer erlaubt.

Die in Abb. 3-29 abgebildeten Spektren des korrespondierenden Ceramids **5** zeigen klare Unterschiede zu denen der Verbindung **2** vor Inkubation mit saurer Sphingomyelinase (Abb. 3-28, durchgezogene Linien). Die Zugabe des Enzyms ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ) bewirkt innerhalb von 90 min eine ausgeprägte Änderung der Spektren (Abb. 3-28, gepunktete Linien). Daraufhin ähneln die Spektren von **2** stark denen des Ceramids **5**. Sowohl die beobachteten Maxima, als auch die absoluten Intensitäten sind nahezu identisch. Die Intensität der Banden, die FRET zugeschrieben werden können (347 nm/536 nm) sinkt durch die Reaktion um 80-90%. Einzig die Emission bei 405 nm steigt beträchtlich (+900%) und liefert ein starkes Signal für die Trennung des Konstrukts. Zusätzlich sinkt, wie erwartet und schon bei Sonde **0** beobachtet, auch die Emission des direkt angeregten Akzeptors (dottergelber Graph), wodurch das verbleibende, störende Hintergrundsignal abgeschwächt wird.

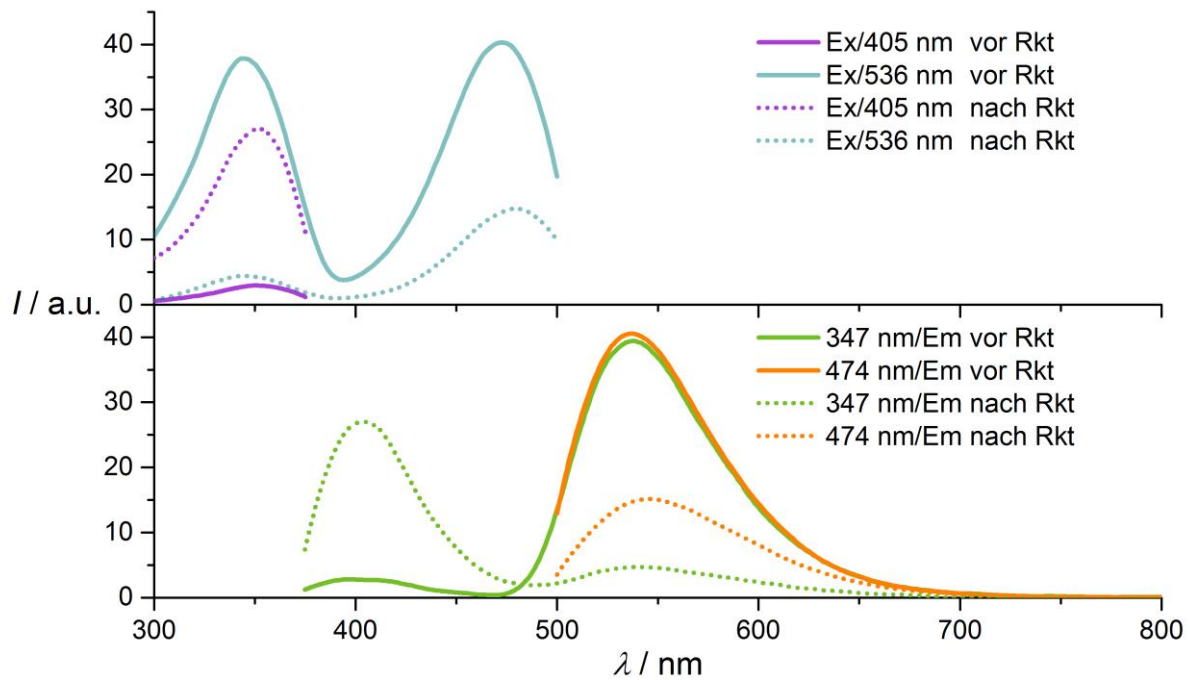


Abb. 3-28 | Fluoreszenzanregungs- (oben) und Fluoreszenzemissionsspektren (unten) der Sonde **2** vor (—) und nach (···) der Reaktion mit ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ) |  $t = 90 \text{ min}$ , Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100, gemeinsame Darstellung im Spektrenanhang.

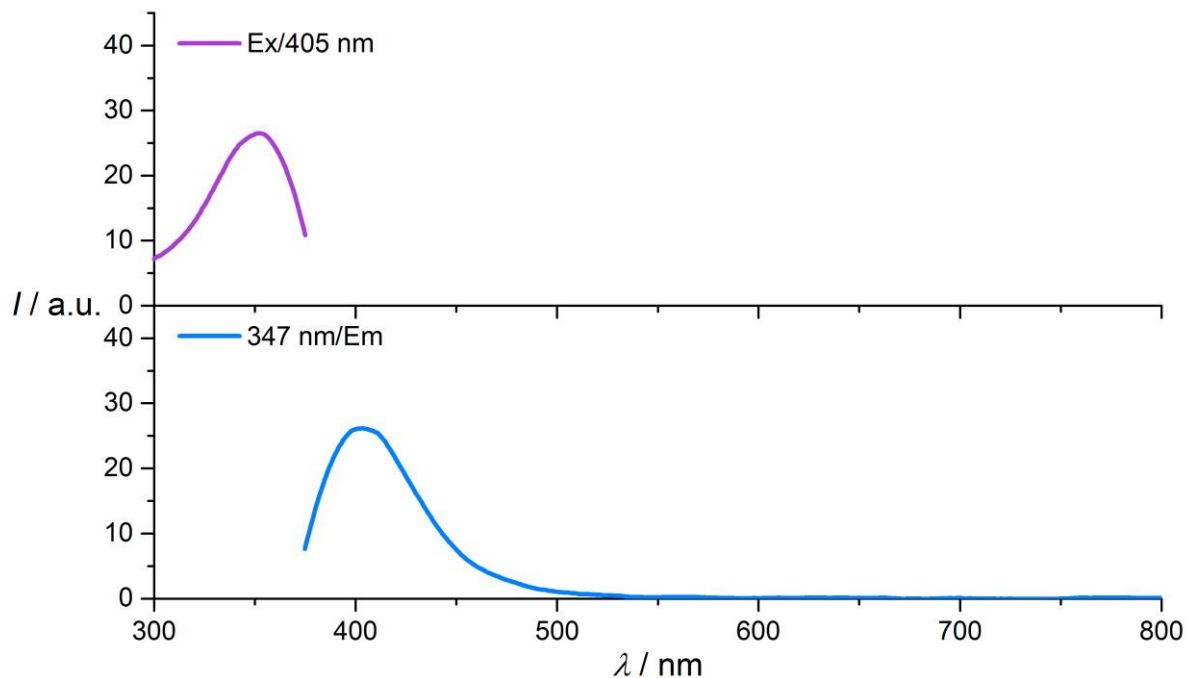


Abb. 3-29 | Fluoreszenzanregungs- (oben) und Fluoreszenzemissionsspektren (unten) von synthetischem MCC-Cer **5**, dem hypothetischen Produkt der ASM-vermittelten Hydrolyse der Sonde **2** |  $c = 1 \text{ } \mu\text{M}$ , Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100.

Konnte vor der Inkubation mit ASM die Emission des FRET-Akzeptors sowohl bei 347 nm als auch bei 474 nm in ähnlichem Maße angeregt werden, so betragen die Werte nach der

Reaktion 11.6% bzw. 35.7% des jeweiligen Startwertes (Abb. 3-28, hellblaue Graphen). In einer idealen FRET-Sonde ohne Umgebungseinflüsse sollte der erste Wert ausschließlich durch die Verminderung des FRET (erster Wert) sinken und die direkte Anregbarkeit des Akzeptors (zweiter Wert) unverändert bleiben. Der konstante zweite Wert kann so als interner Standard genutzt werden um durch Bildung des Quotienten den Reaktionsumsatz zu quantifizieren. Das Absinken des zweiten Wertes im hier vorliegenden Fall verdeutlicht hingegen abermals die schon für Sonde **0** und **1** (siehe z.B. Abb. 3-26) erläuterten Umgebungseinflüsse auf den NBD-Fluorophor wie sie das PS-Konzept beschreibt. Mit der Hydrolyse der Sonde steigt das Ausmaß der Fluoreszenzlöschung des NBD-Chromophors, sodass dessen Emission um etwa  $\frac{2}{3}$  abfällt. Einen umgekehrten Effekt hat die durch ASM-vermittelte Trennung des FRET-Systems auf den Donor (MCC). War dessen Emission zuvor gering, weil FRET seinen elektronisch angeregten Zustand zu Ungunsten direkter Fluoreszenz rasch depopulierte, so erscheint sie nach der Reaktion 10-mal intensiver. Diese verstärkte Emission des FRET-Donors steht im Einklang mit den bereits geschilderten Beobachtungen, die in ihrer Summe eindeutig zeigen, dass auch Verbindung **2** eine FRET-Sonde der sauren Sphingomyelinase (ASM) ist.

Aus den geschilderten Änderungen der Signalintensitäten ergibt sich nach Gl. 7 ein *ratio change* von etwa 80. Dieser Wert ist sowohl im Vergleich mit dem für **1** ermittelten, als auch mit dem *RC* publizierter FRET-Sonden für Lipidasen (siehe Kapitel 1-1-4) ausgesprochen groß. Dies ist ein Indikator dafür, dass dieses Werkzeug sich für einen besonders empfindlichen Nachweis der untersuchten Reaktion eignet.

Im Anschluss wurde die Zeitabhängigkeit der Änderung der Fluoreszenzspektren der Sonde **2** bei Zugabe des Enzyms detaillierter studiert (Abb. 3-30). Die bereits im vorher/nachher-Vergleich diskutierten Änderungen äußern sich im Verlauf der Reaktion kontinuierlich, aber mit sich verlangsamender Geschwindigkeit, bis sich nach etwa 90 min Stagnation einstellt. Die Verlangsamung steht im Einklang mit enzymkinetischen Modellen, wonach die Reaktionsgeschwindigkeit unterhalb der Sättigungskonzentration eine Funktion der Substratkonzentration ist.

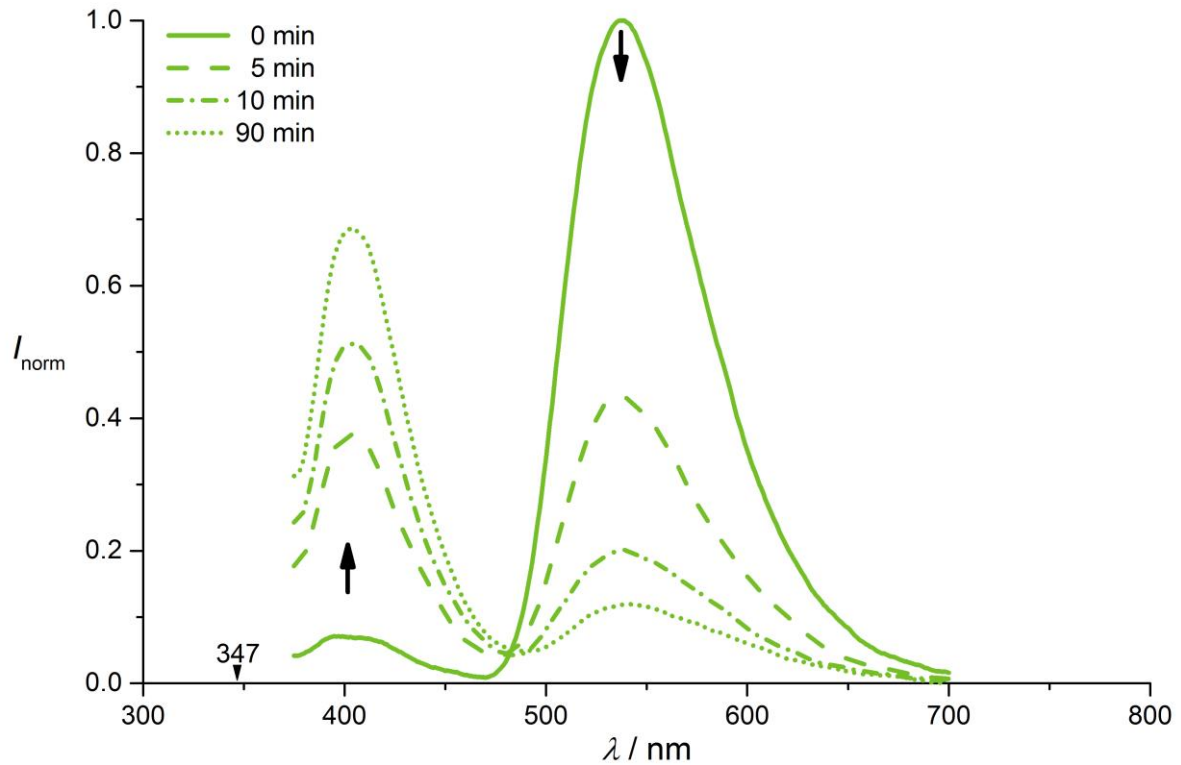


Abb. 3-30 | Zeitliche Änderung des Fluoreszenzemissionsspektrums der Sonde **2** nach Zugabe von rek. humaner ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ) | Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1% TX-100, Anregung: 347 nm, normiert auf den Startwert.

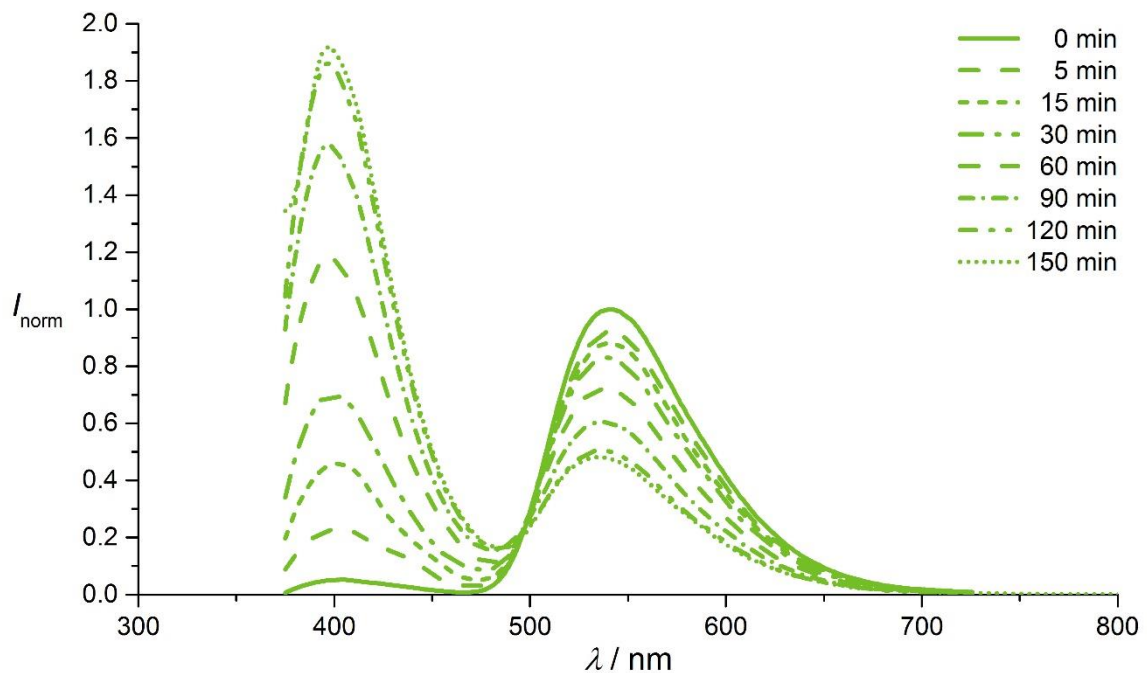


Abb. 3-31 | Zeitliche Änderung der Fluoreszenzemissionsspektren der Sonde **2** (10 mol% in aLUVs) nach Zugabe von rek. humaner ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ) | Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , Anregung: 347 nm, normiert auf den Startwert.

Probeweise wurde Sonde **2** auch in aLUVs (*anionic large unilamellar vesicles*) eingebettet. Dazu wurde eine Mischung aus dem Sondenmolekül mit verschiedenen Lipiden getrocknet und in Puffer durch Ultraschallbehandlung rehydratisiert. Durch Extrusion durch Polycarbonat-Membranen wurden etwa 100 nm große, hohle, sphärische Vesikel erhalten, die von einer Lipiddoppelschicht umgeben sind, in der das Sondenmolekül eingelagert ist. Gegenüber der Verwendung von TX-100-Mizellen stellt diese Darreichung eine noch genauere Imitation des natürlichen Kontexts der ASM dar. Wie auch im Lysosom findet die Reaktion an einer Phospholipid-Membran statt, wobei anionische Lipide (Phosphatidsäure) den Kontakt des Enzyms mit der substrathaltigen Membranoberfläche vermitteln. Wie in Abb. 3-31 gezeigt, wird auch hier ein Substratumsatz beobachtet, wobei die Fluoreszenz bei 536 nm abnimmt und bei 405 nm ansteigt. Bei etwa 51% der initialen Akzeptor-Fluoreszenz stoppt die Reaktion jedoch, d.h. dass **2** nach Inkorporation in Liposomen (aLUVs) nicht mehr vollständig hydrolysiert wird (siehe DC in Abb. 3-34). Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass weder das in die Liposomen integrierte Substrat **2**, noch zugegebene ASM die Membran überwinden (*flip-flop*) und folglich das in der inneren Liposomenseite vorhandene Substrat (etwa die Hälfte der Gesamtmenge) vom Enzym nicht erreicht werden kann. In diesem Fall wird ein  $RC \sim 7$  ermittelt, weil die etwa 50%ige Fluoreszenzabnahme des Akzeptors (536 nm) von einem überproportionalen Anstieg der Fluoreszenz des Donors (405 nm) begleitet wird. Letzteres stellt im Vergleich zu den Experimenten in Mizellen einen substanziellen Unterschied dar und ist vermutlich ein Resultat einer verminderten Fluoreszenzlöschung im hydrophoben Inneren der aLUV-Membran. Erwähnenswerterweise können aus aLUVs Detergenz-freie Extrakte der Reaktionsmischung gewonnen werden. Diese eignen sich aufgrund der Abwesenheit des molekular uneinheitlichen und schwer abtrennbaren TX-100 zum definitiven Nachweis des bei der Hydrolyse von Sonde **2** gebildeten Ceramids **5** ( $[5+H]^+$ :  $m/z$  ber.: 615.4, gef.: 615<sup>+</sup>,  $[5+Na]^+$ :  $m/z$  ber.: 637.4, gef.: 637<sup>+</sup>) mittels HPLC-MS. Trotz einiger positiver Aspekte wurde dieser Ansatz nicht weiterverfolgt, denn die relativ unempfindliche Detektion scheint die zeitintensive Präparation der Liposomen nicht zu rechtfertigen.

Nach den gezeigten erfolgreichen Eignungstests der Sonde **2** wurde anschließend ein Protokoll für einen ASM-Assay entwickelt und eine Bestimmung der FRET-Effizienz vorgenommen.

### 3-4-4 | Entwicklung eines homogenen ASM-Assays

Die in Kapitel 3-4-3 vorgestellten Experimente offenbarten die prinzipielle Eignung der ASM-Sonde **2** zur Bestimmung der ASM-Aktivität. Darauf aufbauend erfolgte die Entwicklung eines parallelisierten homogenen *in vitro* Fluoreszenzassays.<sup>[163]</sup> Zunächst wurde dazu auf die Messung kompletter Spektren zugunsten einer etwa 40-fach verringerten Messzeit und größerer Signalstabilität verzichtet. Anstelle von Spektren wurde nur noch an markanten Punkten des Spektrums (üblicherweise nahe der Fluoreszenzmaxima der beteiligten Fluorophore, 405 und 536 nm, siehe Abb. 3-32) für je 1.0 s statt 0.1 s die Fluoreszenzintensität bei Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 347 nm gemessen. Dadurch war es möglich, das Gerätemaximum von vier Proben gleichzeitig zu messen, die Datenmenge auf die wesentlichen Messgrößen zu reduzieren und die Messintervalle auf 30 s zu verkürzen.

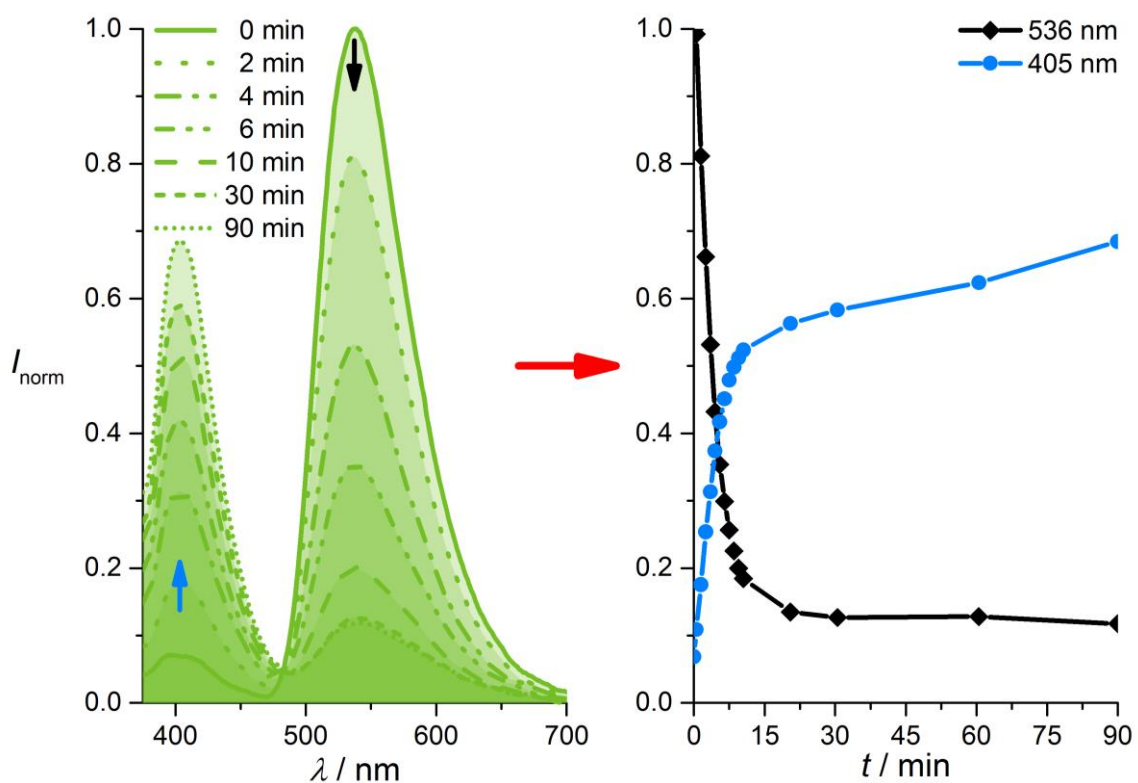


Abb. 3-32 | Schematische Darstellung der Datenauswertung | links: vollständige Spektren, rechts: Intensität bei ausgewählten Wellenlängen 405 nm (blau) und 536 nm (schwarz) nach Zugabe von ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ), Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100, Anregung: 347 nm, Erläuterung im Text.

Die linke Hälfte der Abb. 3-32 zeigt die auf den Ausgangswert bei 536 nm normalisierte Fluoreszenz der Sonde **2**. Bei Inkubation mit ASM fällt dieser Wert zeitabhängig auf etwa 12% des Ausgangswertes und bleibt nach beendeter Hydrolyse auf diesem Niveau. Wie

bereits in Kapitel 3-4-3 diskutiert, kann dies auf die Abnahme des FRET während der Reaktion zurückgeführt werden. Zeitgleich steigt die Donor-Fluoreszenz bei 405 nm an. Beide Trends spiegelt auch die reduzierte Darstellung (Abb. 3-32, rechts) wider. Die Zugabe verschiedener Enzympräparationen zeigte, dass das Signal bei 405 nm stark von deren Art und Menge abhing und dass dieser Untergrund zusätzlich zeitlich nicht konstant war. Es scheint plausibel, dass dies durch Autofluoreszenz (z.B. von aromatischen Aminosäuren) hervorgerufen wird, welche bei Entfaltung der Proteine eine Änderung erfährt. Dagegen war das Signal bei 536 nm stabil und unempfindlich gegenüber derartigen Effekten. Es lieferte eine verlässliche Aussage über die Intaktheit der Sonde **2**. Durch Abzug der am Ende verbleibenden, in einem Kontrollexperiment ermittelten Rest-Fluoreszenz von den Messwerten bei 536 nm wurde ein Wert zwischen 0 und 1 erhalten, der als Maß für den verbleibenden FRET ( $F_r$ ) genutzt wurde. Darauf basierend wurde ein Protokoll (siehe Experimenteller Teil, Abschnitt 6-6-1) für einen homogenen ASM-Assay entwickelt, als dessen Ergebnis  $F_r(t)$  erhalten wird. Anschließend wurde dieser Assay genutzt um verschiedene ASM-Präparate unter Variation der Reaktionsbedingungen qualitativ zu charakterisieren.

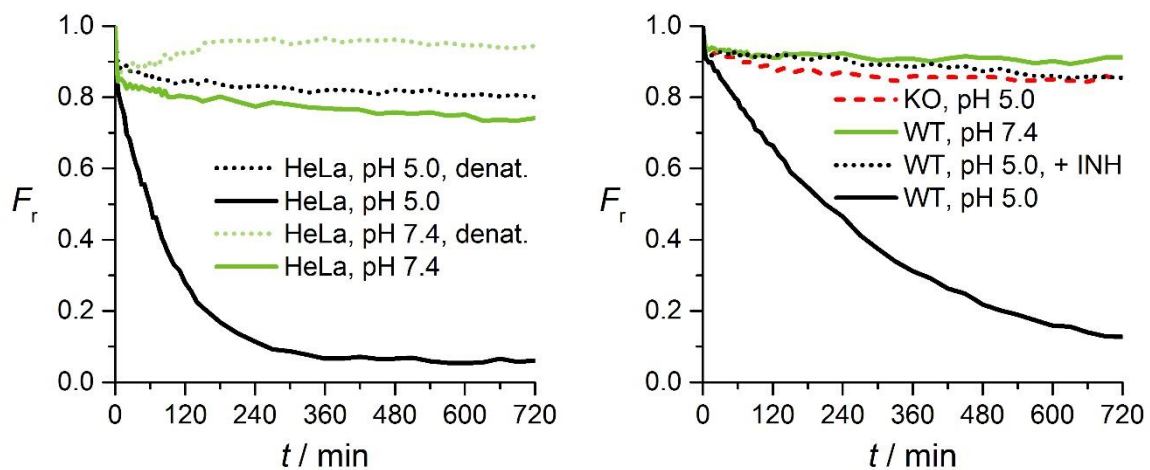


Abb. 3-33 | ASM-Assay | links: Test von HeLa-Zelllysaten ( $\beta = 3 \cdot 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ ) auf ASM-Aktivität. Als Kontrolle diente ein thermisch (3 min) denaturiertes Aliquot der untersuchten Lysate (denat.). rechts: ASM-Aktivität von ASM-defizienten (KO) und ASM-positiven (WT) MEF-Lysaten ( $\beta = 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ ) bei Inkubation unter ASM- (pH 5.0, 0.1 M NaOAc, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100) bzw. NSM-Bedingungen (pH 7.4, 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% TX-100) ggf. in Gegenwart des ASM-Inhibitors INH (1-*O*-Hexadecylsulfonyl-*myo*-inosit-3,5-bisphosphat,  $c = 10 \text{ } \mu\text{M}$ , Synthese publiziert in [15,16]).

Wie in Abb. 3-33 dargestellt, zeigt der im Rahmen dieser Arbeit etablierte ASM-Assay, dass auch Lysat von HeLa-Zellen unter ASM-Bedingungen einen Umsatz der Sonde **2** bewirkt. Bei Zugabe thermisch denaturierter, inaktiver Präparate hingegen wird kaum eine



Änderung des Startwertes beobachtet. Eine Kontrolle des Messwertes bei 405 nm zeigte Stagnation auf niedrigem Niveau, weshalb das langsame Absinken von  $F_r$ , dass besonders bei Zugabe großer Proteinmengen beobachtet wird, vermutlich auf Aggregationsphänomenen beruht. In NSM-Puffer zeigen sowohl natives als auch denaturiertes Lysat keine Aktivität.

Eine noch gezieltere Aussage erlaubt die in Abb. 3-33 gezeigte Verwendung von Lysaten wildtypischer (WT) und ASM-*knockout* (KO) MEFs (murine embryonale Fibroblasten), die von Prof. Dr. E. GULBINS und Dr. K. BECKER-FLEGLER (Universität Duisburg-Essen) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt wurden. Diese unterscheiden sich in erster Linie im Vorhandensein der ASM. Während  $F_r$  bei Zugabe von KO-Lysat unter ASM-Bedingungen nach einer kurzen Initiationsphase bei etwa 85-90% der Ausgangsintensität stagniert, zeigt die gleiche Proteinmenge WT-Lysat bei gleichen Bedingungen eine kontinuierliche Abnahme des Messwertes. In Anwesenheit eines bekannten ASM-Inhibitors<sup>[15,16]</sup> ist die Reaktion stark verlangsamt, bei neutralem pH ist das WT-Lysat komplett inaktiv (siehe auch Abb. 3-34, B). Dies unterstreicht auch die Inertheit der Sonde gegenüber anderen lysosomalen Enzymen mit saurem pH-Optimum (etwa Lipasen und Phosphatasen).

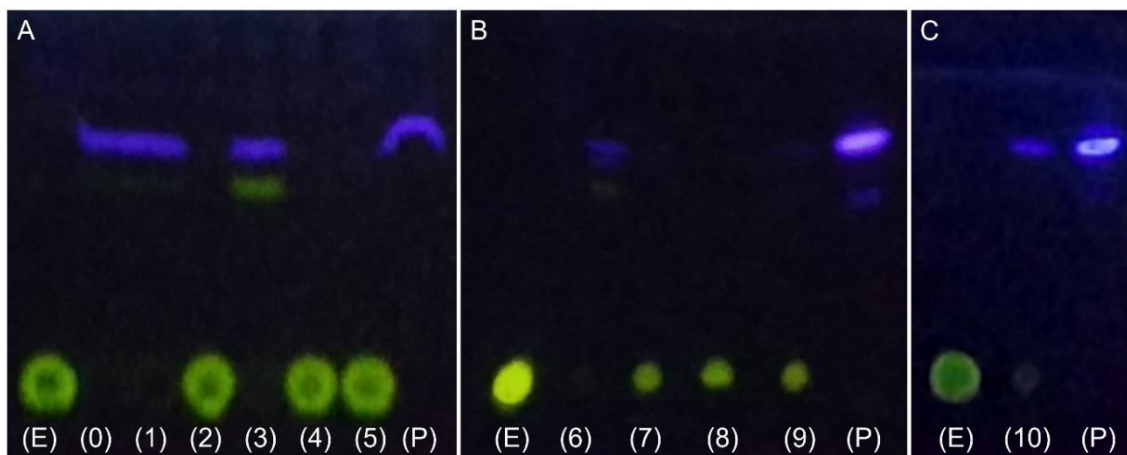


Abb. 3-34 | Dünnschichtchromatogramme | Aufgetragen sind Lipidextrakte der Assayreaktionsmischungen nach Inkubation von Sonde **2** mit rek. humaner ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ), HeLa-Zelllysaten ( $\beta = 3 \cdot 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ ) oder Lysaten von ASM-defizienten (KO) und ASM-positiven (WT) MEFs ( $\beta = 10^{-1} \text{ g L}^{-1}$ ) unter ASM- (pH 5.0, 0.1 M NaOAc, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100) bzw. NSM-Bedingungen (pH 7.4, 50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% TX-100), ggf. bei Anwesenheit des ASM-Inhibitors INH (1-*O*-Hexadecylsulfonyl-*myo*-inosit-3,5-bisphosphat,  $c = 10 \text{ }\mu\text{M}$ , Synthese publiziert in <sup>[15,16]</sup>), entwickelt in CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 100:15:1, (E) intakte Sonde **2** als Ref., (P) synth. MCC-Cer **5** als Ref., **A** | (0) **2** + ASM, 90 min, (1) **2** + ASM, 60 min, + ASM, 30 min, (2) **2** + denat. HeLa, pH 5.0, 18 h, (3) **2** + HeLa, pH 5.0, 18 h, (4) denat. HeLa, pH 7.4, 18 h, (5) HeLa, pH 7.4, 18 h, **B** | (6) **2** + WT, pH 5.0, 18 h, (7) **2** + KO, pH 5.0, 18 h, (8) **2** + WT, pH 7.4, 18 h, (9) **2** + INH + WT, pH 5.0, 18 h, **C** | (10) **2** in aLUVs + ASM, pH 5.0 (ohne TX-100), 2.5 h, Bahn (2)-(5) bzw. (6)-(9) zeigen den Endpunkt der Experimente in Abb. 3-33, links bzw. rechts.



Zur Verifizierung der ASM-katalysierten Hydrolyse wurden die Reaktionen nach der Inkubation mit ASM mit Methanol gestoppt, die Lipide durch FOLCH-Verteilung<sup>[160]</sup> extrahiert und per Dünnschichtchromatographie analysiert (siehe Abb. 3-34). Unter Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) zeigen Proben mit ASM-Aktivität unpolare violett fluoreszierende Substanzflecken (identisch mit synthetischem MCC-Ceramid **5**, bestätigt auch per HPLC-MS) während ansonsten hochpolare gelb fluoreszierende Substanzflecken das Vorhandensein unveränderter Sonde **2** anzeigen. Auch hier zeigen Lysate von HeLa-Zellen ausschließlich bei saurem pH Aktivität, unter NSM-Konditionen bleibt die Sonde intakt. Denaturierte Lysate sind inaktiv. Eine weitere gelb fluoreszierende Bande unterhalb derer von MCC-Ceramid konnte bislang keiner bekannten Verbindung zugeordnet werden. Möglicherweise handelt es sich hier um ein molekular uneinheitliches Umesterungsprodukt der NBD-haltigen Sonde mit dem verwendeten Detergenz TX-100. Bekanntermaßen katalysiert ASM derartige Nebenreaktionen, darauf weist auch der Umstand hin, dass diese sowohl bei Verwendung von denaturiertem Enzym als auch bei pH 7.4 oder Ersatz des Detergenz durch eine liposomale Formulierung (Abb. 3-34, C) ausbleibt.

Zusammengenommen belegen die erläuterten Experimente, dass die beobachtete zeitliche Abnahme von  $F_r$  ausschließlich von der Anwesenheit intakter ASM abhängt. Neutrale Sphingomyelinasen scheinen in den verwendeten Enzympräparaten entweder nicht vorzukommen oder sie sind unter den gegebenen Bedingungen nicht in der Lage, das Substrat zu verstoffwechseln. Die hohe Selektivität des Assays gegenüber den unzähligen anderen Enzymen, die im verwendeten Roh-Lysat potentiell enthalten sind, mag auf den ersten Blick erstaunen. Sie dürfte jedoch zu einem großen Teil auf die in der Synthese des Sphingomyelin-Analogons **2** unternommenen Anstrengungen zur bestmöglichen Imitation der Stereochemie, Polarität und funktionellen Gruppen des natürlichen Substrats zurückzuführen sein. So bestätigt sich auch im Nachhinein die gewählte Strategie, möglichst wenig Kompromisse einzugehen.

Nachdem die Nutzung des neu etablierten ASM-Assays zur qualitativen Detektion der ASM-Aktivität erfolgreich demonstriert werden konnte, wurden anschließend quantitative Messungen unternommen. Wie in Abb. 3-35 gezeigt, erlaubt der Assay auch eine Differenzierung der ASM-Aktivität über mindestens vier Konzentrationsgrößen-

ordnungen. Über den gesamten untersuchten Bereich führt die Zugabe der entsprechenden Enzymverdünnung zu zeitlich abnehmenden Kurven mit deutlich unterschiedlicher Steigung. Sie zeigen, dass die Hydrolysegeschwindigkeit mit der Menge des zugegebenen Enzyms korreliert, was eine Detektion von ASM-Konzentrationen im niedrigen pikomolaren Bereich (etwa 30 pM) gestattet.

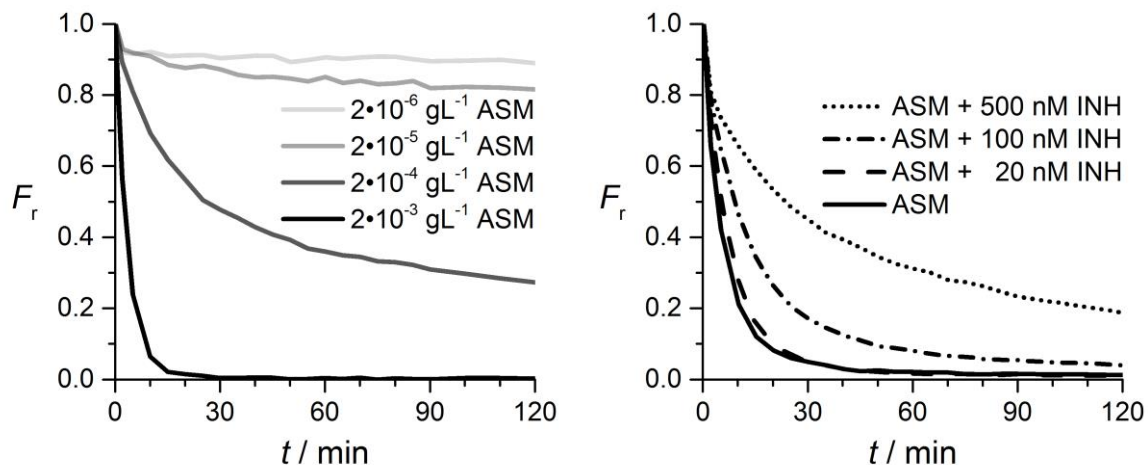


Abb. 3-35 | Konzentrationsabhängigkeit des ASM-Assays | links: verschiedene Enzymkonzentrationen, rechts: Effekt verschiedener Konzentrationen des ASM-Inhibitors INH (1-*O*-Hexadecylsulfonyl-*myo*-inosit-3,5-bisphosphat, Synthese publiziert in <sup>[15,16]</sup>) bei Inkubation mit rek. humaner ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ), Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1% TX-100.

In gleicher Weise eignet sich der Assay auch zur Bestimmung relativer ASM-Aktivitäten bei Anwesenheit eines ASM-Inhibitors in Proben mit gleicher formaler Enzymkonzentration (Abb. 3-35, rechts). Es wird eine dosisabhängige Inhibition der Enzymaktivität durch den exemplarisch ausgewählten Inhibitor INH<sup>[15,16]</sup> beobachtet. Aus den Steigungen der vier Graphen im Intervall [0.85, 0.80] wurde der in Abb. 3-36 gezeigte prozentuale Umsatz berechnet.

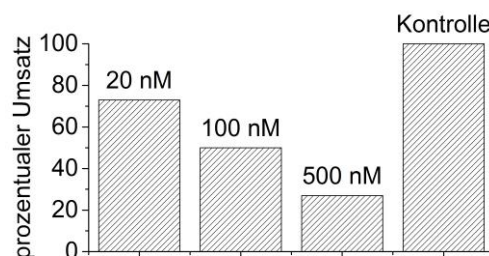


Abb. 3-36 | Prozentualer Umsatz der Sonde 2 im ASM-Assay in Gegenwart der angegebenen Konzentration des ASM-Inhibitors INH | INH = 1-*O*-Hexadecylsulfonyl-*myo*-inosit-3,5-bisphosphat (Synthese publiziert in <sup>[15,16]</sup>), Enzymquelle: rek. humane ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ), Werte bezogen auf die Kontrolle ohne Inhibitor, in Einfachbestimmung, Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1% TX-100.

Das Intervall wurde gewählt um einerseits die teils beobachtete unspezifische Abnahme von  $F_r$  während der ersten Minuten auszublenden, aber andererseits Artefakte durch eine unterschiedliche Konzentration des noch zur Verfügung stehenden Substrats zu minimieren. Aus dem Umsatz wurde eine relative Inhibition bei der jeweiligen Inhibitor-konzentration ermittelt (siehe Tab. 3-2).

Tab. 3-2 | Inhibition der ASM-katalysierten Hydrolyse der Sonde **2** durch den ASM-Inhibitor INH | INH = 1-*O*-Hexadecylsulfonyl-*myo*-inosit-3,5-bisphosphat (Synthese publiziert in [15,16]), Enzymquelle: rek. humane ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ), in Einfachbestimmung, Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100.

$C_{\text{INH}} / \text{nM}$	$t_{85} / \text{min}$	$t_{80} / \text{min}$	$\Delta t / \text{min}$	Steigung / $\mu\text{mol h}^{-1}$	Inhibition / %
0	0.61	0.91	0.30	-10.0	0
20	1.11	1.52	0.41	-7.3	27
100	1.39	1.99	0.60	-5.0	50
500	1.25	2.35	1.10	-2.7	73

Unter den beschriebenen Umständen liegt der  $IC_{50}$  des verwendeten Inhibitors bei etwa 100 nM. Bei 500 nM wird eine Inhibition von 73% beobachtet, was in gutem Einklang mit einer vorangegangenen Messung mittels des radioaktiven Assays ( $76 \pm 3\%$ )<sup>[16]</sup> steht. Auch wenn die Datenlage keine definitive Aussage zulässt, scheint der Fluoreszenz-basierte im Vergleich mit dem radioaktiven Assay keine offenkundigen Artefakte abzubilden, ihre Kinetik scheint vergleichbar zu sein. Folglich stellt der hier vorgestellte erste homogene Assay zur Untersuchung der ASM-Aktivität eine nützliche Erweiterung des Methodenarsenals, speziell zum *screening* nach ASM-Inhibitoren dar.

Da der Einsatz von aufgereinigten Enzympräparationen in der Praxis für viele Anwendungen zu aufwändig ist, galt es die Eignung des Assays für die Untersuchung von Zelllysaten zu untersuchen. Bei der Zugabe von MEF-Lysaten (siehe Abb. 3-37) wurde eine von der zugegebenen Menge abhängige Änderung von  $F_r$  beobachtet, während KO-Lysat keine Reaktion anzeigte. Nach Gabe zusätzlicher rekombinanter ASM zum KO-Lysat-haltigen Medium (bei  $t = 150 \text{ min}$ ) erfolgte rasch eine vollständige Hydrolyse des verbleibenden Substrats, wobei ein von der Menge des in der Probe befindlichen Proteins unabhängiges Basisniveau erreicht wurde. Aus den Steigungen wurden wie zuvor Umsätze berechnet und mit der Proteinmenge ins Verhältnis gesetzt. Dabei wurden spezifische Aktivitäten von  $1.1\text{-}1.4 \cdot 10^{-6} \text{ mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  ermittelt, die in der Größenordnung der mittels des radioaktiven Assays ermittelten endogenen ASM-Aktivität von  $8.1(\pm 5.5) \cdot 10^{-6} \text{ mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  (bezogen auf Gesamtprotein) liegen.<sup>[164]</sup>

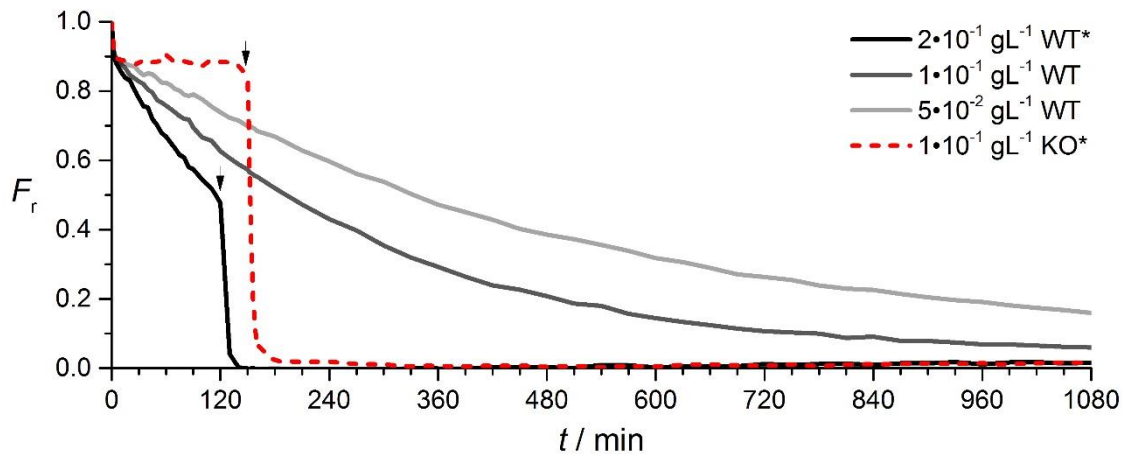


Abb. 3-37 | Konzentrationsabhängigkeit des ASM-Assays | Gezeigt ist der zeitliche Verlauf von  $F_r$  bei Inkubation von ASM-defizienten (KO) und ASM-positiven (WT) MEF-Lysaten unter ASM-Bedingungen (pH 5.0, 0.1 M NaOAc, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100), \* = zum mit ↓ markierten Zeitpunkte (120 min bzw. 150 min) wurde rek. humane ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ) zugegeben.

Da die erhaltenen Kurven für 0.2, 0.1 und 0.05 g L<sup>-1</sup> WT-MEF-Lysat alle zwischen denen von  $2 \cdot 10^{-4}$  und  $2 \cdot 10^{-5} \text{ g L}^{-1}$  rekombinanter ASM (Abb. 3-35) liegen, kann ihr ASM-Gehalt auf 0.4-1.0 ‰ der Gesamtproteinmasse eingegrenzt werden. Die angegebenen Werte sollten trotz allem unter Vorbehalt verstanden werden. Zum einen wurden aufgrund der apparativen Begrenzungen nur Einfachbestimmungen vorgenommen. Zum anderen wurde das Verfahren mit rekombinanter humaner ASM kalibriert, die je nach Charge des verwendeten Enzyms leicht voneinander abweichende absolute Umsätze ergab. Des Weiteren zeigte sie eine starke Empfindlichkeit gegenüber der Detergenzienzusammensetzung im Reaktionsgemisch. Möglicherweise ist auch das beobachtete unspezifische Absinken von  $F_r$  zu Beginn einer jeden Messung auf einen solchen Detergenzeffekt zurückzuführen. Aus den geschilderten Gründen bleiben die Ergebnisse auf relative Aussagen beschränkt. Dies entspricht der gängigen Praxis zum *screening* von Inhibitoren – der geplanten Hauptanwendung dieses Assays. Durch Vergleich mit einem unter identischen Bedingungen ermittelten Blindwert können so potentielle Inhibitoren aus einer gegebenen Substanzbibliothek selektiert und mit dem radioaktiven Assay verifiziert werden. Dieses Vorgehen verringert den Einsatz radiomarkierten Sphingomyelins und stellt durch Verwendung eines natürlichen Substrats trotzdem sicher, dass die beobachteten Effekte keine Artefakte sind, die von den Fluorophoren hervorgerufen werden.

Ein weiteres *downscaling* der benötigten Probemenge und die Übertragung in ein *high-throughput*-Format können durch die Nutzung eines Mikrotiterplattenlesegerätes erreicht werden. Allerdings erfordert dessen Nutzung erheblichen Optimierungsbedarf um auch unter dynamischen Messbedingungen reproduzierbare Daten zu erhalten, denn die Geometrie, Lichtquelle und die Steuerung des verwendeten VictorX von Perkin-Elmer bieten nicht annähernd die Qualität des Varian-Fluoreszenzspektrometers. Prinzipiell war es möglich, die Trends der Sondenhydrolyse (verminderter FRET, erhöhte Fluoreszenzemission des Donors) auch im Mikrotiterplattenlesegerät zeitaufgelöst zu verfolgen, aus zeitlichen Gründen bleibt die Fortentwicklung dieses Assays aber zukünftigen Arbeiten vorbehalten.

### 3-4-5 | FRET-Effizienz

Die FRET-Effizienz  $E$  ist das zentrale Maß zur Quantifizierung des FRET-Prozesses, da sie meist auch ohne die genaue Kenntnis schwer zugänglicher physikalischer Parameter (Quantenausbeute, lokaler Brechungsindex) nach Gl. 3 (Kapitel 3-4-5) berechnet werden kann. Voraussetzung dafür ist die Vermessung des Donors in An- und Abwesenheit des Akzeptors unter exakt gleichen Bedingungen. Da die in dieser Arbeit entwickelten Sonden jedoch kovalente Konstrukte sind, erweist sich letzteres als kritisch. Da die zielgerichtete Darstellung von einfach Donor-markierten Konstrukten eine drastische Ausweitung des Synthesaufwands bedeutet hätte und deren Kopfgruppe zudem stark verändert wäre, wurde nach einer alternativen Möglichkeit gesucht. Dazu wurde zunächst unter der Annahme, dass sich Sonde **2** und ihr mithilfe von Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) reduziertes Pendant in der selben lokalen Umgebung aufhalten, ein Versuch unternommen, die zur Berechnung von  $E$  benötigten Werte zu messen. Dazu wurden initiale Fluoreszenzanregungs- und -emissionsspektren der Sonde **2** gemessen und anschließend ein großer Überschuss Dithionit zugegeben<sup>[114]</sup> um den NBD-Chromophor zum nicht-fluoreszierenden Anilinderivat ABD zu reduzieren (siehe Abb. 3-38). Die Reaktion erfolgte sehr schnell; schon nach einer halben Minute wurde keine NBD-Fluoreszenz mehr detektiert. Da die Fluoreszenz des MCC-Fluorophors dadurch jedoch nicht anstieg, ist davon auszugehen, dass das ABD-Chromophor zwar nicht mehr fluoresziert, aber weiterhin als FRET-Akzeptor fungiert, es also in einen *dark quencher* umgewandelt wurde. Dieses Ergebnis kann daher nicht zur angestrebten Berechnung von  $E$  herangezogen werden. Das Resultat wirft zudem Zweifel an der allgemeinen Anwendbarkeit der vielgenutzten Methode der

FRET-Quantifizierung mittels Akzeptor-*bleaching* auf, denn auch hier wird der Akzeptor nicht zwangsläufig komplett entfernt, sondern lediglich in ein „stummes“, nicht-fluoreszierendes Produkt umgewandelt, das ggf. weiter als FRET-Akzeptor dienen kann.

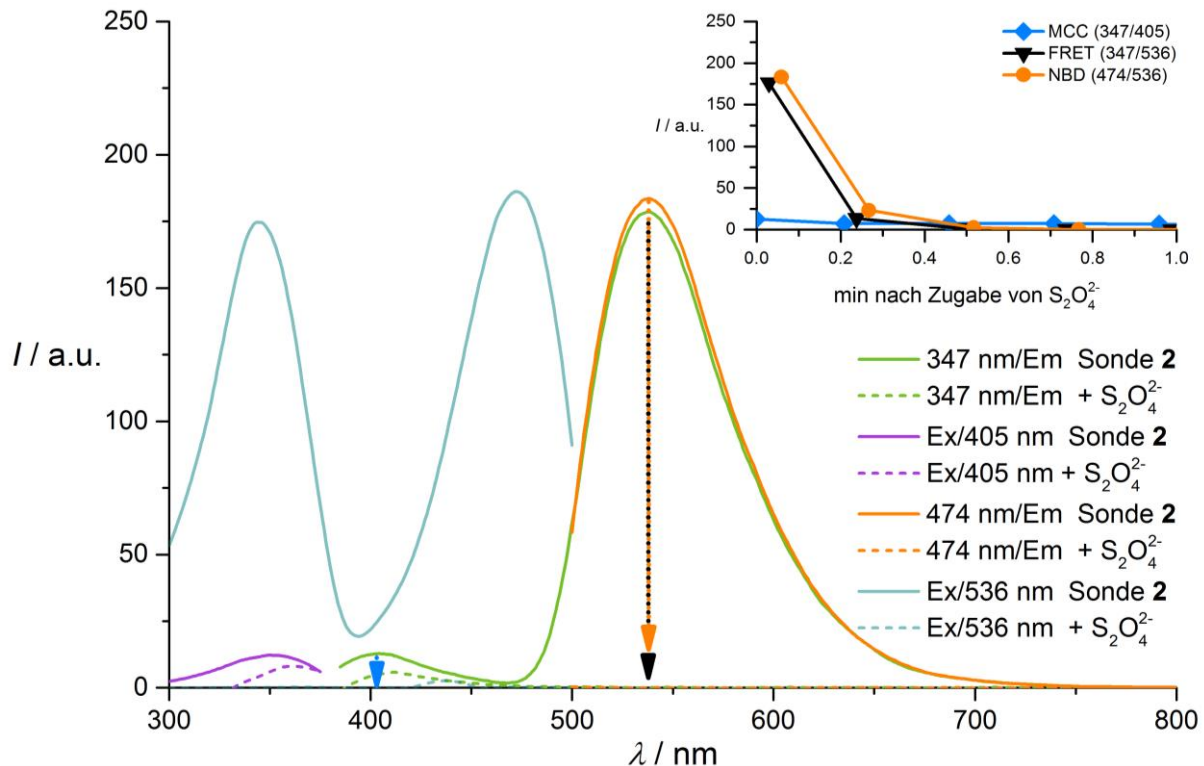


Abb. 3-38 | Absolute Fluoreszenzintensität von Sonde **2** ( $c = 1 \mu\text{M}$ ) vor (—) und nach (---) Zugabe von  $3 \mu\text{L}$  einer eiskalten  $1 \text{ M Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -Lösung<sup>[114]</sup> in  $100 \text{ mM Tris-Puffer (pH 10)}$  bei  $37^\circ\text{C}$  | Einsatz: zeitlicher Verlauf bei ausgewählten Wellenlängen (Pfeile), Medium:  $0.1 \text{ M NaOAc pH 5.0}$ ,  $150 \text{ mM NaCl}$ ,  $0.1 \text{ mM ZnSO}_4$ ,  $0.1\% \text{ TX-100}$ .

Trotz des oben geschilderten, unter Berücksichtigung seiner besonderen Umgebung an der Mizelloberfläche nicht zu vernachlässigenden, Beitrags des Akzeptors zu den physikalischen Eigenschaften des Gesamtmoleküls, musste mangels Alternativen das Spektrum der Sonde **2** in Abwesenheit des Akzeptors durch Messung einer gleich konzentrierten Lösung des MCC-Ceramids **5** angenähert werden. Dieses Vorgehen schien insbesondere deshalb brauchbar, da die absolute Intensität der Donorfluoreszenz der geschnittenen Sonde **2** nahezu identisch mit der einer definierten Lösung des MCC-Ceramids **5** war (siehe Abb. 3-39). Aus den Spektren konnte ein Verhältnis  $I_{\text{DA}}/I_{\text{D}}$  von rund 0.1 ermittelt werden, was nach Gl. 3 einer FRET-Effizienz von  $E = 90\%$  entspricht. Dieser Wert ist vergleichsweise groß,<sup>[165]</sup> wobei verschiedene Methoden zur Bestimmung von  $E$  den Vergleich erschweren. So werden für Fusionsproteine der FPs Cerulean und Venus<sup>[166]</sup> mittels fluoreszenzmikroskopischer Techniken Werte von unter  $33\%$  berichtet. Mit  $E = 99\%$  ermittelten ZHANG *et al.* für ein Konstrukt von Bordipyrrromethen und Rhodamin Werte

nahe am theoretischen Maximum, allerdings waren die Fluorophore in diesem Fall konjugiert (sogenannter *through-bond-FRET*).<sup>[139]</sup>

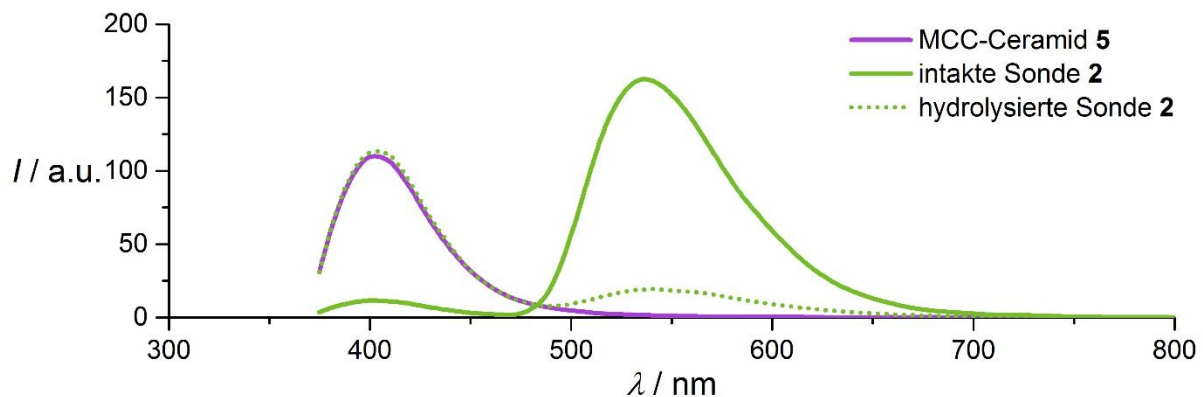


Abb. 3-39 | Fluoreszenzemissionsspektren von synthetischem MCC-Cer 5, sowie Sonde 2 vor und nach Inkubation mit ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$ ) | alle  $c = 1 \text{ } \mu\text{M}$ ,  $t = 90 \text{ min}$ , Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100, Anregung: 347 nm. Der Quotient der Integrale unter grüner und violetter Kurve im Intervall [375 nm, 470 nm] beträgt 0.105, das Verhältnis der Intensität bei fixer Wellenlänge von 405 nm beträgt 0.104.

Aus dem hier ermittelten Wert von 90% kann mithilfe von Gl. 4 ein relativer Abstand von etwa  $0.7 R_0$  ermittelt werden. Eine Einordnung dieses Ergebnisses ist unter der gegebenen Literaturdatenlage schwierig. Der Wert liegt deutlich unter  $1.26 R_0$ , der für DCIA-markiertes *activated protein C* in Kontakt zu NBD-markierten Phospholipiden berichtet wird.<sup>[167]</sup> Da das Cumarin DCIA jedoch nicht identisch mit dem hier verwendeten MCC ist, erlaubt der für dieses Paar bestimmte FÖRSTER-Radius  $R_0$  von 3.96 nm nur eine grobe Einordnung. Es bleibt anzumerken, dass für intermolekulare Protein-Lipid-Wechselwirkungen naturgemäß größere Abstände zu erwarten sind als für die hier vorgestellte kovalente *small molecule* FRET-Sonde. Für letztere wurde mittels *molecular modeling* (Chem3D Pro) ein räumlicher Abstand der jeweiligen konjugierten Systeme der Fluorophore von etwa 17 Å ermittelt, der im intakten Molekül aufgrund der kovalenten Verknüpfung nicht überschritten werden kann. Dieser Abstand ist für ein FRET-System vergleichsweise gering, was eine Grundvoraussetzung für die hier beobachtete hohe FRET-Effizienz ist. Den Wert von 90% zugrunde gelegt, können weitere Aussagen bezüglich der Zerfallsraten des angeregten Zustands abgeleitet werden. Basierend auf Gl. 2<sup>[138]</sup> (Kapitel 1-5-6) kann konstatiert werden, dass der FRET-Prozess ( $k_T$ ) im betrachteten Molekül mindestens eine Größenordnung schneller abläuft als die Emission ( $k_E$ ) oder Fluoreszenzlöschung ( $k_L$ ), was die eingangs erwähnte Überlegenheit kleiner Moleküle gegenüber FP-basierten FRET-Sonden eindrucksvoll unterstreicht.



### 3-5 | Zweiphotonenanregungsfluoreszenzmikroskopie

Nach erfolgreicher Nutzung der Sonde **2** zur Bestimmung von ASM-Aktivität *in vitro* erfolgten fluoreszenzmikroskopische Studien an Sonden-haltigen magnetischen *lipid beads* und an lebenden Zelllinien von murinen embryonalen Fibroblasten (MEF). Zur Schonung des biologischen Materials wurde Zweiphotonenanregung verwendet.

#### 3-5-1 | 2PE-Fluoreszenzmikroskopie auf *lipid beads*

Zunächst wurden magnetische *lipid beads* mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Diese dienten als statische Modelle einer mit den Sonden belegten Lipidmembran ohne enzymatische Aktivität. Dazu wurden Silica-Partikel mit einem magnetischen Kern und einem durchschnittlichen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  nach Literaturvorschrift<sup>[168]</sup> mit zuvor präparierten Liposomen beschichtet, welche mit 10% Sonde **2** oder 10% MCC-Ceramid **5** dotiert wurden. Erste Experimente mit einer Zweiphotonenanregung (2PE) bei 710 nm zeigten, dass die immobilisierte intakte Sonde **2** NBD-Fluoreszenz, aber keine messbare MCC-Fluoreszenz emittiert (Abb. 3-40).

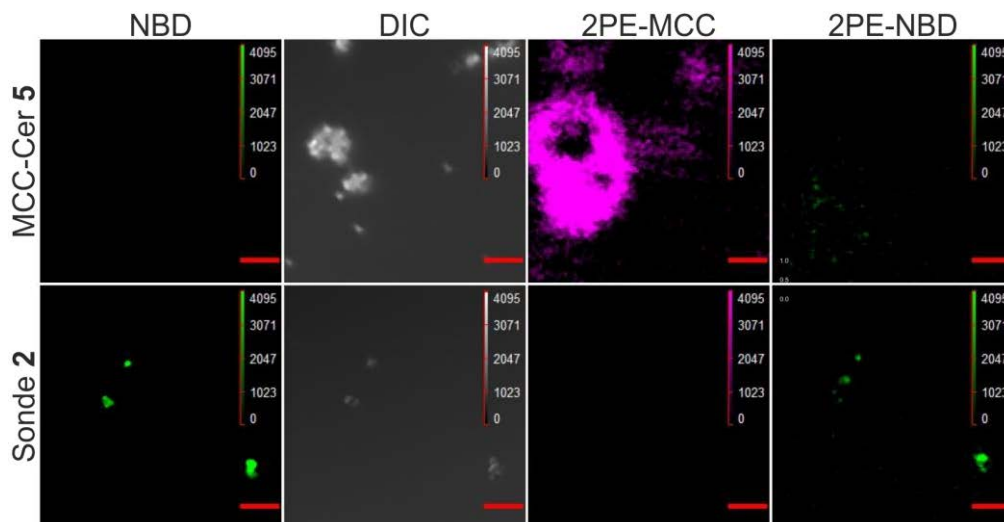


Abb. 3-40 | Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *lipid beads* | Die *beads* wurden mit anionischen Liposomen (aLUVs) beschichtet, welche ihrerseits mit 10% MCC-Cer **5** (oben) oder Sonde **2** (unten) dotiert wurden. von links nach rechts: NBD nach Anregung bei 488 nm, DIC = Differentialinterferenzkontrast, MCC nach Zweiphotonenanregung, NBD nach Zweiphotonenanregung, der rote Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Durch intensive Belichtung eines ausgewählten Areals des Bildausschnitts mit 488 nm Laserlicht für 10 s konnte ein *bleaching* des FRET-Akzeptors NBD erzielt werden, wodurch im gewählten Bereich das NBD-Signal stark abnahm und gleichzeitig ein MCC-Signal erschien (Abb. 3-41). Dies belegt einen sehr effizienten FRET von bis zu 90% (siehe Anhang,



Abb. 9-16) und eine geringe Queranregung von NBD unter den gewählten Bedingungen. Nach erfolgreichem Abschluss dieser Vorversuche wurde vom statischen Modell zu lebenden Zellen gewechselt.

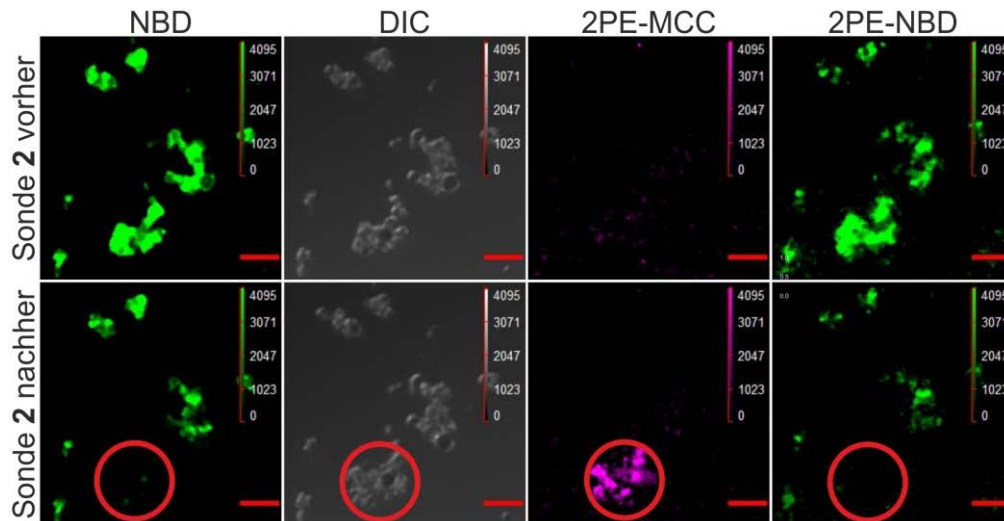


Abb. 3-41 | Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von *lipid beads* vor (oben) und nach (unten) *bleaching* des FRET-Akzeptors NBD im markierten Areal (roter Kreis) | Die *beads* wurden mit anionischen Liposomen (aLUVs) beschichtet, welche ihrerseits mit Sonde **2** dotiert wurden. von links nach rechts: NBD nach Anregung bei 488 nm, DIC = Differentialinterferenzkontrast, MCC nach Zweiphotonenanregung, NBD nach Zweiphotonenanregung. Der rote Balken entspricht 10 µm.

### 3-5-2 | 2PE-Fluoreszenzmikroskopie in lebenden Fibroblastenkulturen

Zum Studium der Sonde **2** in lebenden Zellen wurden murine embryonale Fibroblasten (MEFs) kultiviert und mit **2** inkubiert. Dazu wurden drei Zelllinien verwendet:

- 1.) Wildtyp MEFs (WT)
- 2.) ASM überexprimierende MEFs (OE), die aus ersteren mittels Lipofektion mit ASM-codierendem Plasmid erzeugt wurden und vermehrt ASM bilden
- 3.) ASM knockout MEFs (KO), die keine ASM bilden

Zunächst wurden die Anregungsparameter variiert, um eine möglichst empfindliche Detektion der Analyten und eine schonende Bildgebung zu realisieren. Eine Zweiphotonenanregung (2PE) bei 730 nm erwies sich als vorteilhaft um unter den apparativen Gegebenheiten möglichst selektiv MCC anzuregen und Autofluoreszenz der Zellen gering zu halten. Zudem konnte durch den konsequenten Ausschluss von Fremdlicht das Grundrauschen der 2PE-Mikroskopie verringert werden, welches während der

Experimente an *lipid beads* noch deutliche Artefakte verursacht hatte. Anschließend wurde untersucht, wie Sonde **2** möglichst schonend appliziert werden kann. Dazu wurde sie in Form von DMSO-Stammlösung, 1:1 BSA-Komplexen oder 10%igen aLUVs zum Medium gegeben. Alle drei Formulierungen führten zur fluoreszenten Markierung der Zellen. Zunächst wurden kernferne Strukturen und die fädigen zytoplasmatischen Fortsätze (siehe Abb. 3-42) eingefärbt, was durch eine Einlagerung des synthetischen Lipids in die äußere Membran erklärt werden kann. Es zeigte sich, dass die in DMSO gelösten Lipide in serumfreiem Medium sehr rasch inkorporiert werden. Nach 20 min zeigten die so behandelten Zellen jedoch bereits deutliche Anzeichen für ein Absterben, die sich in einer Ausstülpung der Zellmembran und späterem Verlust ganzer Membranabschnitte äußerten (Abb. 3-42).

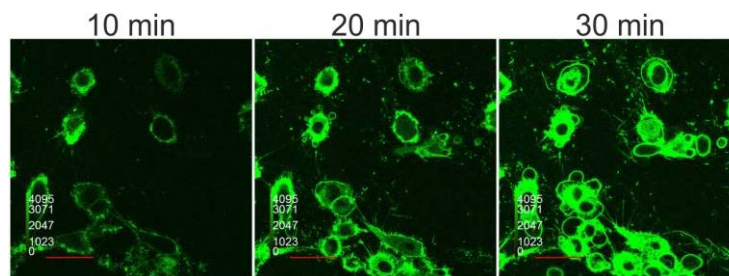


Abb. 3-42 | Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von MEFs, die in Abwesenheit von Serum mit 5 µM Sonde **2** für die angegebenen Zeiträume inkubiert wurden | Gezeigt ist jeweils NBD nach Anregung bei 488 nm. Der rote Balken entspricht 50 µm.

Als Konsequenz daraus war in nachfolgenden Experimenten immer Serum zugegen. Die Verwendung von aLUVs zur Applikation der Sonde zeigte in Anwesenheit von Serum keinen Vorteil gegenüber der Darreichung mittels BSA-Komplexen und führte neben der gewünschten Anfärbung der Zellen auch zur Bildung stark fluoreszierender Partikel außerhalb der Zellen. Da Serum stets Albumine enthält, die mit Lipiden Komplexe bilden können, ist anzunehmen, dass sowohl bei Zugabe von in Liposomen inkorporierter oder in DMSO gelöster Sonde zwischenzeitlich Albumin-Komplexe der Sonde gebildet werden. Dies erklärt die geringen Unterschiede zwischen den Formulierungen bezüglich der Zellanfärbung in Gegenwart von Serum. Auch die beobachtete rasche Entfärbung von markierten Membranen bei Wechsel des BSA-haltigen Mediums (der deswegen vermieden wurde) könnte darauf zurückzuführen sein, dass Albumine zur Extraktion der Sonde aus einer Lipidmembran fähig sind. Aufgrund der aufwändigen Herstellung der aLUVs und der deutlichen zytotoxischen Effekte von DMSO fiel die Wahl für Folgeexperimente auf BSA-komplexierte Sonde **2** in serumhaltigem Medium.

BSA-Komplexe bis zu 5  $\mu\text{M}$  riefen in den Zellen keine negativen Effekte, wie den Verlust der Zellintegrität, hervor. Sie wurden nicht nur relativ rasch in die Membran inkorporiert, sondern wurden (wahrscheinlich durch Endozytose) in allen drei verwendeten Zelllinien auch in das Zellinnere aufgenommen. Durch *bleaching*-Experimente konnte auch in der lebenden Zelle FRET von MCC zu NBD nachgewiesen werden (Abb. 3-43), da die intensive Belichtung eines ausgewählten Areals mit Licht der Anregungswellenlänge des Akzeptors NBD dessen Intensität stark reduzierte und gleichzeitig die Intensität der Fluoreszenz des Donors MCC zunahm.

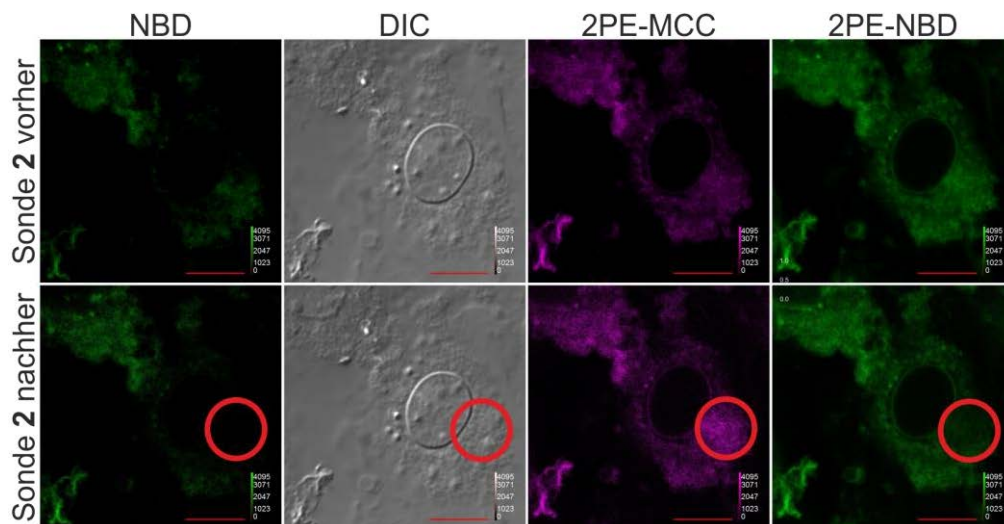


Abb. 3-43 | Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen vor und nach *bleaching* des FRET-Akzeptors NBD im markierten Areal (roter Kreis) einer WT-MEF-Zelle, die mit 5  $\mu\text{M}$  BSA-komplexierter Sonde **2** für 6 h inkubiert wurde | von links nach rechts: NBD nach Anregung bei 488 nm, DIC, MCC nach Zweiphotonenanregung, NBD nach Zweiphotonenanregung. Der rote Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Nach diesen initialen Tests wurde untersucht, ob die *in vitro* gezeigte, ASM-katalysierte Hydrolyse der Sonde **2** auch in Zellen beobachtet werden kann, d.h. ob sich die resultierende Reduktion der Anzahl der Moleküle mit intaktem FRET-System mikroskopisch verfolgen lässt. Da aufgrund der technischen Gegebenheiten nicht am Emissionsmaximum (405 nm), sondern nur an der Schulter der MCC-Fluoreszenz (Violett-Kanal: 420-460 nm) gemessen werden konnte, erwies sich die Detektion des MCC-Fluorophors als verhältnismäßig unempfindlich. Zusätzlich wurde die Detektion der zeitlichen Änderung des FRET durch thermische Fokusdrift und die Überlagerung des Hydrolyseschritts mit zellulären Transportprozessen (etwa der Endozytose) erschwert. Die angestrebte zeitaufgelöste Bildgebung (*live-imaging*) der ASM-katalysierten Hydrolyse der Sonde konnte infolgedessen nicht realisiert werden, da die benötigten Beobachtungszeiträume im Bereich von Tagen liegen und weder das Zellmaterial noch die

Verfügbarkeit des Mikroskops derartig lange Messungen gestatteten. Deshalb wurden mehrere Aliquote der zu untersuchenden Zellen gleichzeitig mit der Sonde versetzt und bis zu ihrer Verwendung im Dunklen kultiviert. In größeren Zeitintervallen wurden Schnappschüsse aufgenommen, wobei für jeden Zeitpunkt ein neues Präparat genutzt wurde. Diese Aufnahmen zeigen verschiedene Trends. In WT-Zellen etwa kann über einen Zeitraum von 72 h eine Abnahme der NBD-Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung von MCC konstatiert werden. Die verwendeten Zellen verteilen die Sonde **2** nicht gleichmäßig über ihr Zytoplasma, stattdessen wird sie in punktförmigen Strukturen lokal angereichert. Diese Strukturen zeigen Kolo­kalisierung mit Lysotracker DeepRed, weshalb angenommen werden kann, dass es sich dabei um Endosomen/Lysosomen handelt (Abb. 3-48). Im Einklang mit dem Modell des Sphingomyelin-Abbaus<sup>[4]</sup> werden die Sonden­moleküle offenbar in Vesikel (Endosomen oder Lysosomen) eingeschlossen, die aus endozytierten Abschnitten der äußeren Zellmembran hervorgehen. In diesen Vesikeln wird die NBD-Fluoreszenz mit der Zeit immer schwächer, während parallel das MCC-Signal in kernnahen Bereichen (auch außerhalb dieser Vesikel) steigt. Dies steht im Einklang mit dem Modell, dass nach ASM-katalysierter Hydrolyse von Sphingomyelin dessen Abbauprodukte (z.B. Fettsäuren) aus dem Lysosom entlassen werden und zur Synthese neuer Lipide im GOLGI wiederverwertet werden.

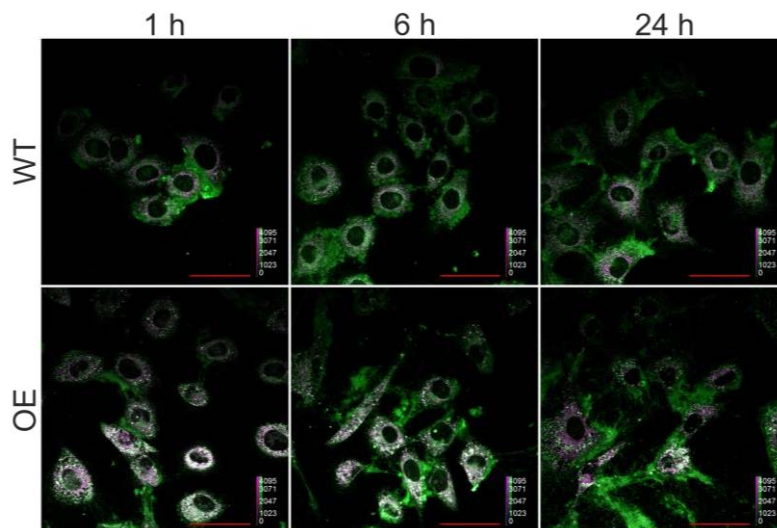


Abb. 3-44 | Überlagerung mikroskopischer Aufnahmen von WT (oben) und ASM-OE (unten) MEFs nach Inkubation mit 1  $\mu$ M BSA-komplexierter Sonde **2** über die angegebenen Zeiträume | Gezeigt sind NBD-Fluoreszenz (grün) und MCC-Fluoreszenz (magenta) nach Zweiphotonenanregung bei 730 nm. Weiße Bildpunkte zeigen Kolo­kalisierung an. Alle Skalen sind einheitlich eingeteilt. Der rote Balken entspricht 50  $\mu$ m.

Wie in der Zeitreihe (Abb. 3-44) gezeigt, wird die intakte Sonde (grün) von den beiden ASM-positiven Zelllinien von außen aufgenommen und verstoffwechselt, wodurch von

FRET-Akzeptor NBD getrenntes MCC (magenta) gebildet wird. Das MCC-haltige Produkt verbleibt nicht am Reaktionsort, sondern reichert sich rund um den Zellkern (runde, dunkle Strukturen) an. Weiße Bildpunkte entstehen durch Überlagerung grüner und magenta-farbener Bereiche (Kokalisation) und sind deshalb ein Indiz für das gleichzeitige Vorliegen von Produkt und Edukt der beobachteten Reaktion, also den hypothetischen Reaktionsort. Eine Kokalisation dieser Orte mit dem verwendeten *lysotracker* wird durch das vorhandene Material zwar nahegelegt, aber nicht sicher bewiesen. Diese Unsicherheit resultiert aus der Tatsache, dass die Strahlengänge für 1PE- und 2PE-Modus nicht identisch sind und deren Bilder infolgedessen aus einer anderen leicht versetzten Beobachtungsebene stammen. Dies ist, neben der prinzipiellen Verschiedenheit der Ein- und Zweiphotonenabsorption, auch eine Erklärung für die Unterschiede zwischen den 1PE- und 2PE-Bildern des gleichen Chromophors (Abb. 3-43).

Es kann ferner festgestellt werden, dass nach 24 h noch immer substantielle Mengen der intakten Sonde vornehmlich in kernfernen Bereichen detektiert werden. Dieses Ergebnis deckt sich mit einer anderen Studie, in der nach 24 h ca. 75% Umsatz beobachtet wurde.<sup>[169]</sup> Zur Verifizierung der gemachten Beobachtungen wurden parallel zu den mikroskopischen Experimenten nach denselben Zeitintervallen Lipid-Extrakte der mit der Sonde **2** inkubierten Zellen gewonnen und mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion (FLD) analysiert. Dabei zeigte sich, dass tatsächlich MCC-Ceramid gebildet wird (siehe Spektrenanhang). Doch auch nach 48 h lassen sich mittels HPLC-FLD noch Reste der intakten Sonde **2** in den WT-Zellen nachweisen (siehe Abb. 3-45 und Anhang, Abb. 9-3).

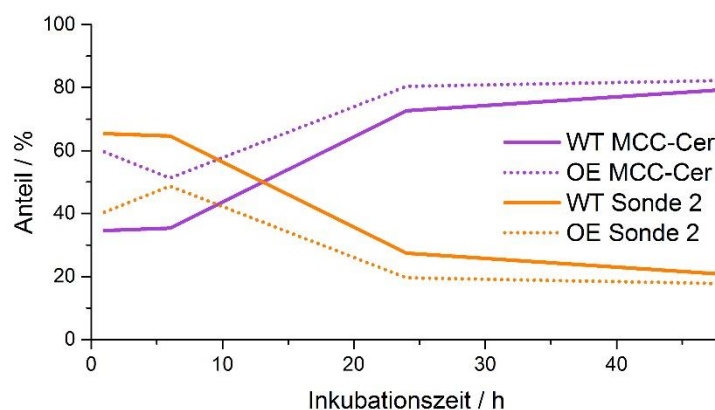


Abb. 3-45 | Zeitlicher Verlauf der prozentualen Anteile der Sonde **2** und des Produkts MCC-Cer in Ganzzell-extrakten | WT-Zellen (—) bzw. OE-Zellen (···), die durch Transfektion eines ASM-codierenden Plasmids in WT-Zellen 24 h vor Zugabe der Sonde **2** erhalten wurden, wurden mit 1  $\mu$ M Sonde **2** inkubiert. Nach den angegebenen Zeiten wurden die Lipide extrahiert und mittels HPLC-FLD analysiert wie im Experimentellen Teil beschrieben. Die Zuordnung erfolgte anhand synthetischer Standards. Die Anteile beziehen sich auf die Summe der beiden betrachteten Lipide.

Dieser Befund unterstreicht die geringe Geschwindigkeit des konstitutiven Abbaus der Sonde in nicht stimulierten Zellen. Verglichen mit den wildtypischen MEFs zeigen die ASM-überexprimierenden OE-MEFs erwartungsgemäß eine vermehrte MCC-Fluoreszenz die sich auch in einer stärkeren Kolo-kalisation niederschlägt (Abb. 3-44). Zu einer Quantifizierung der Hydrolysegeschwindigkeit mittels Mikroskopie reichte die Messgenauigkeit der Methode jedoch nicht aus. HPLC-Analysen bestätigen, dass der Prozess der zur Bildung von MCC-Ceramid führt, in OE-MEFs schneller abläuft (siehe Anhang, Tab. 9-1). Folglich kann konstatiert werden, dass die Sonde auch in der lebenden Zelle ein Substrat der ASM darstellt und ihr Umsatz eine Aussage über die Aktivität der ASM zulässt. Überdies steht dieses Ergebnis im Einklang mit anderen Studien, in denen ASM-Überexprimierung eine Verstärkung jener Effekte bewirkte, die der ASM und ihrem Folgeprodukt Ceramid zugeschrieben werden.<sup>[43,170]</sup>

Nachdem Aktivitätsunterschiede zwischen WT- und OE-Zellen abgebildet werden konnten, stellte sich die Frage, wie sich der hypothetische Endzustand der Reaktion bei vollständiger Hydrolyse der Sonde unter dem Mikroskop darstellt. Zudem erschien es einer Untersuchung wert, ob auch die Effekte von außen zugegebener (exogener) ASM abgebildet werden können. Die Behandlung von Zellen mit exogener Sphingomyelinase simuliert die Sekretion des Enzyms und führt auf der Außenseite der Zellmembran zu einer Änderung des Sphingomyelin/Ceramid-Verhältnisses.<sup>[171]</sup> Die Bedeutung dieses bereits in Kapitel 1-1-3 erläuterten Zusammenhangs wurde in verschiedenen Studien gezeigt und ist ausschlaggebend etwa bei der Metastasierung von Melanom-Zellen<sup>[45]</sup> oder zur Weiterleitung proapoptotischer Signale in Rahmen des *lipid signaling*.<sup>[27,29]</sup> Wie bereits erläutert, war die konstitutive, lysosomale Hydrolyse der Sonde **2** in WT-Zellen vergleichsweise langsam, sodass selbst nach 48 h noch kein vollständiger Umsatz erreicht war. Günstigerweise könnte gerade diese Langsamkeit des konstitutiven, lysosomalen Abbaus die Beobachtung einer zusätzlichen schnellen Reaktion nach stimulierter Sekretion oder Gabe exogener Sphingomyelinase erlauben. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden WT-Zellen für 24 h mit Sonde **2** vorinkubiert und anschließend mit einer zweiten Portion der Sonde **2** versetzt. 30 Minuten später wurde bakterielle Sphingomyelinase aus *Staphylococcus aureus* (bacSM) zugegeben. Dieses Vorgehen stellt eine gängige Methode dar, um die Sekretion der ASM zu simulieren.<sup>[172,173]</sup>



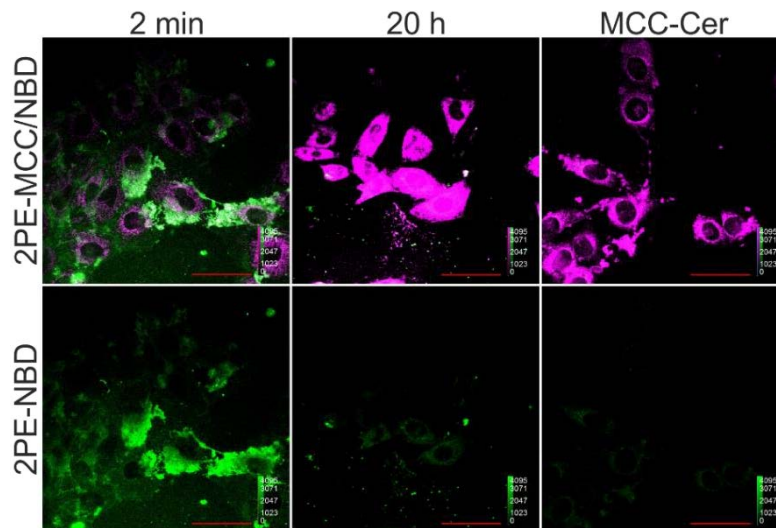


Abb. 3-46 | Erscheinungsbild von WT-MEFs nach Inkubation mit Sonde **2** oder synthetischem MCC-Cer **5** | Unten: NBD-Fluoreszenz (grün), Oben: Überlagerung von NBD-Fluoreszenz (grün) und MCC-Fluoreszenz (magenta), jeweils nach Zweiphotonenanregung bei 730 nm, von links nach rechts: vorkonditionierte\* WT-MEFs nach 2 min Inkubation mit  $0.5 \text{ U mL}^{-1}$  bakterieller Sphingomyelinase aus *Staphylococcus aureus*, dieselben nach 20 h, sowie unbehandelte WT-MEFs nach 40 min Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  BSA-komplexiertem MCC-Cer **5**. Weiße Bildpunkte zeigen Kolokalisation an. Alle Skalen sind einheitlich eingeteilt. Der rote Balken entspricht  $50 \mu\text{m}$ . \* Zur Vorkonditionierung wurden die Zellen für 24 h mit  $1 \mu\text{M}$  BSA-komplexierter Sonde **2** und anschließend für 30 min mit einem zweiten Aliquot der Sonde **2** vorbehandelt.

Tatsächlich zeigen die dabei erhaltenen Aufnahmen (Abb. 3-46), dass die zugesetzte Sphingomyelinase eine Abnahme der NBD-Fluoreszenz und eine Zunahme der MCC-Fluoreszenz in weit größerem Ausmaß bewirkt, als es allein die endogene ASM-Aktivität der unstimulierten Zellen vermag. Der innerhalb von 20 h erreichte Zustand zeigte starke Ähnlichkeit zu WT-Zellen, die direkt mit dem Reaktionsprodukt MCC-Cer **5** inkubiert wurden. Deshalb ist es plausibel anzunehmen, dass dieser Zustand den Endpunkt bei vollständiger Hydrolyse der Sonde **2** repräsentiert. Damit zeigt dieses Experiment auch die prinzipielle Möglichkeit der Beobachtung einer stimulierten ASM-Aktivität vor dem Hintergrund des konstitutiven Abbaus der Sonde.

Während also exogene Sphingomyelinase eine vollständige Sondenhydrolyse bewirkt und in ASM-überexprimierenden OE-Zellen eine Beschleunigung und Intensivierung der in WT-Zellen geschilderten Trends beobachtet wird (siehe Abb. 3-44), bieten ASM-defiziente KO-Zellen ein deutlich verschiedenes Bild (Abb. 3-47). Zwar nehmen auch sie die Sonde auf, jedoch nimmt die (direkt angeregte) NBD-Fluoreszenz über die Beobachtungsdauer von 72 h kaum ab. Stattdessen wird das NBD-Signal in diesen Zellen in deren zahlreichen und deutlich vergrößerten Vesikeln konzentriert, die mit einem *lysotracker* kolokalisieren (Abb. 3-48).

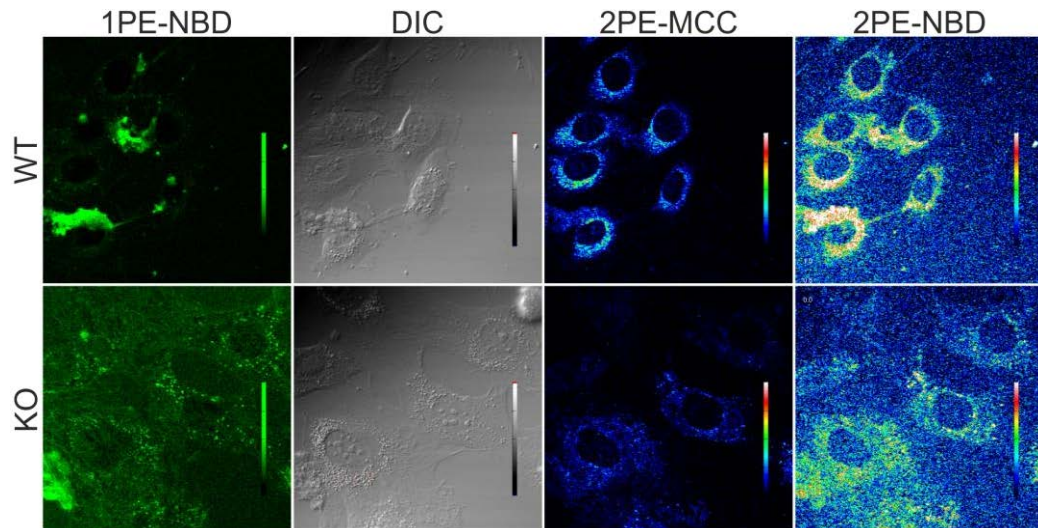


Abb. 3-47 | Vergleich mikroskopischer Aufnahmen von WT (oben) und ASM-KO (unten) MEFs nach 72 h Inkubation mit 1  $\mu$ M BSA-komplexierter Sonde **2** | von links nach rechts: NBD nach Anregung bei 488 nm, DIC, MCC nach Zweiphotonenanregung, NBD nach Zweiphotonenanregung. Der Bildausschnitt beträgt 150x150  $\mu$ m.

Zusammengenommen deutet dies darauf hin, dass die NBD-haltige Kopfgruppe der Sonde nicht durch Hydrolyse in eine wässrige Umgebung entweicht, sondern in einer relativ unpolaren Umgebung (wahrscheinlich der lysosomalen Membran) verbleibt. Bemerkenswerterweise zeigt eine merkliche MCC-Fluoreszenz nach Zweiphotonenanregung (Abb. 3-49) entgegen der Ergebnisse des homogenen Assays, dass auch in KO-Zellen eine Trennung von MCC und NBD stattfindet.

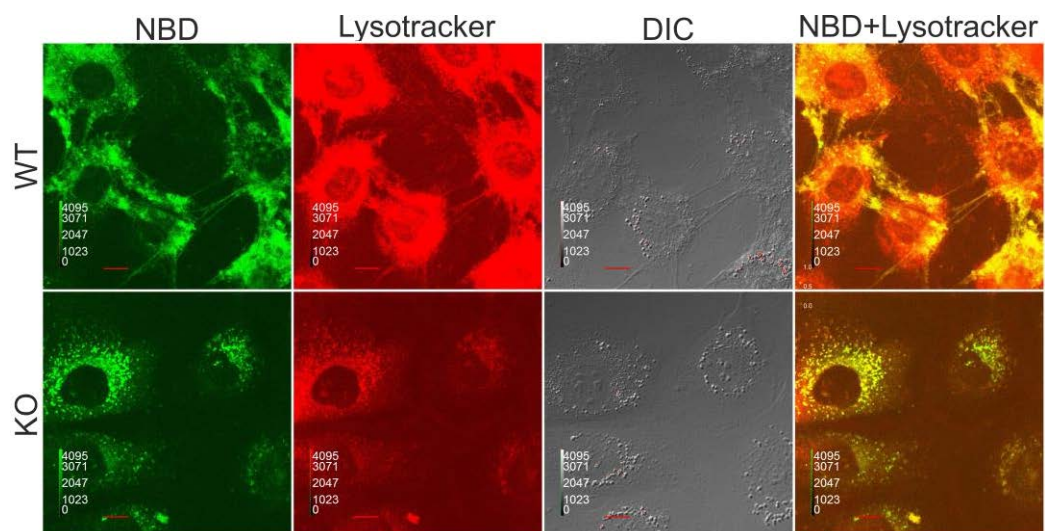


Abb. 3-48 | Vergleich mikroskopischer Aufnahmen von WT (oben) und ASM-KO (unten) MEFs nach 48 h Inkubation mit 1  $\mu$ M BSA-komplexierter Sonde **2** | von links nach rechts: NBD nach Anregung bei 488 nm, Lysotracker DeepRed nach Anregung bei 635 nm, DIC, Überlagerung der Bilder von NBD (grün) und Lysotracker DeepRed (rot). Gelbe Bildpunkte zeigen Kolokalisation an. Der rote Balken entspricht 10  $\mu$ m.



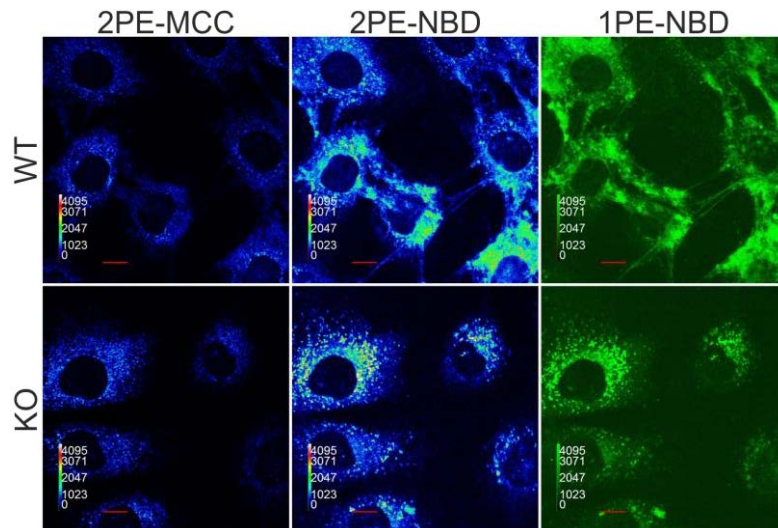


Abb. 3-49 | Vergleich mikroskopischer Aufnahmen von WT (oben) und ASM-KO (unten) MEFs nach 48 h Inkubation mit 1  $\mu$ M BSA-komplexierter Sonde **2** | von links nach rechts: MCC nach Zweiphotonenanregung, NBD nach Zweiphotonenanregung, NBD nach Einphotonenanregung. Alle Skalen sind einheitlich eingeteilt. Der rote Balken entspricht 10  $\mu$ m.

Dieser nur in der lebenden Zelle beobachtete Widerspruch zur Theorie wurde genauer mittels HPLC-FLD untersucht. Überraschenderweise wurde dabei auch in KO-Zellen MCC-Cer gefunden. Da KO-Lysate im homogenen Assay keine ASM-Aktivität aufweisen, muss das MCC-Cer entweder durch einen mehrstufigen Prozess oder andere (neutrale) Sphingomyelinasen gebildet worden sein. Letztere zeigen im homogenen Assay unter neutralen Bedingungen und bei Anwesenheit des Aktivators  $Mg^{2+}$  zwar keinerlei Aktivität, dies muss in zellulärer Umgebung jedoch nicht notwendigerweise ebenso zutreffen. Neben MCC-Cer wurden zusätzlich weitere Stoffwechselprodukte detektiert (siehe Spektrenanhang), die aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften wahrscheinlich ebenfalls MCC enthalten. Da diese Produkte bei Kontroll-Lipofektion mit Wasser nicht detektiert werden, müssen sie direkt auf die zugegebene Sonde zurückgehen und können nicht vollständig endogenen Ursprungs sein. Eine absolute Quantifizierung der Bildungsgeschwindigkeit der verschiedenen Metabolite in den Extrakten aus OE, WT und KO-MEFs ist aufgrund der verschiedenen Vermehrungsrate und Größe der Zellen schwierig. Massenspektren des Extrakts lieferten keine belastbaren Hinweise auf die Identität der fraglichen Stoffwechselprodukte, deren biologische Relevanz folglich nicht abschließend aufgeklärt werden konnte. Ein möglicher Kandidat für den unidentifizierte Metaboliten ( $R_t = 1.9$  min) ist MCC-Ceramid-1-phosphat, welches durch PLD-artige Hydrolyse in einem Reaktionsschritt aus Sonde **2** gebildet werden könnte. Phospholipase D (PLD) katalysiert den Kopfgruppenaustausch von Phospholipiden durch Umesterung mit kleinen Alkoholen (Umesterung) und Wasser (Hydrolyse). Sie konvertiert konstitutiv die zur Sonde **2**

strukturell sehr ähnlichen Lipide Phosphatidylcholin und Phosphatidylethanolamin zu Phosphatidsäure und einem Aminoalkohol. Theoretisch ist so eine Art Phospholipid-*scrambling* denkbar. Alternativ könnte auch die Hydrolyse der Amidbindung des Konstrukts durch Ceramidasen und ähnliche Enzyme die beobachtete Trennung der Fluorophore der Sonde hervorrufen.

Zusammengenommen deuten die Ergebnisse auf das Vorhandensein eines alternativen Abbaupfads des zugegebenen Sphingomyelin-Analogons hin. Es kann nur gemutmaßt werden, dass die beobachteten Anomalien im Sphingolipidstoffwechsel der KO-Zellen eine Anpassung an die Abwesenheit funktionaler ASM sind. Dieser Befund deckt sich mit früheren Arbeiten von LEVADE *et al.* mit  $^3\text{H}$ -markiertem Substrat an Zellen von Patienten mit NIEMANN-PICK-Krankheit Typ A,<sup>[169]</sup> in denen ebenfalls ein Hintergrundumsatz festgestellt werden konnte, ohne den Mechanismus aufklären zu können. Die in dieser Arbeit entwickelte Sonde erlaubt prinzipiell die zukünftige Strukturaufklärung der gebildeten Metabolite. Sollte ein solcher alternativer Abbaupfad auch für natürliches Sphingomyelin in weiteren Zelltypen existieren, stellt sich die Frage, wieso er nicht auch die fatale Ansammlung von Sphingolipiden verhindert, die die NIEMANN-PICK-Krankheit hervorrufen. Letztlich stützen die Ergebnisse das gängige Modell,<sup>[4]</sup> nachdem weniger die Art des akkumulierten Lipids, sondern vielmehr die Speicherung selbst (unabhängig vom Metaboliten) die Symptome dieser und anderer Lipidspeicherkrankheiten bewirkt. Interessanterweise zeigen kultivierte ASM-KO-Fibroblasten zwar eine Akkumulation von Lipiden in zahlreichen, großen Vesikeln, diese hemmt ihr Wachstum aber keineswegs. Der Fakt, dass sie sich im Gegenteil deutlich rascher teilen, könnte auf einen Kompensationsmechanismus hindeuten, der eine „Verdünnung“ der Speichervesikel bewirkt und so negative Effekte hinauszögert. Auch das zeitlich verzögerte Einsetzen der NIEMANN-PICK-Symptome drei bis vier Monate nach der Geburt betroffener Kinder deutet daraufhin, dass weniger toxische Metabolite, sondern vielmehr eine schleichende Lipid-Überfrachtung der Zellen die Symptome verursachen. Möglicherweise existiert zwar ein alternativer Abbaupfad von Sphingomyelin, dieser ist jedoch nicht schnell genug, um die Ausbildung des pathologischen Phänotyps dauerhaft zu verhindern. Das eingehende Studium dieses interessanten Stoffwechselweges, etwa durch PLD-Inhibition oder Zugabe synthetischer Ceramid-1-phosphat-Analoga, könnte wertvolle Einblicke in das Netzwerk des Sphingolipid-Metabolismus liefern. Zudem deutet der unterschiedliche Phänotyp von ASM-KO- und WT-MEFs bei Inkubation mit **2** an, dass die im Rahmen dieser Arbeit

entwickelte Sonde möglicherweise zum Test auf das Vorhandensein funktionaler ASM im Rahmen der Diagnose anhand von NIEMANN-PICK-Patientenbiopsien eingesetzt werden könnte.

### 3-6 | Kritische Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgestellten Sonden stellen eine substanzielle Erweiterung des Methodenarsenals zum Studium der ASM dar. Trotz ihrer vorteilhaften Eigenschaften in den gezeigten Anwendungsbeispielen sollen einige kritische Punkte nicht unerwähnt bleiben. Um Fehlinterpretationen zu vermeiden, sollte sich der Nutzer stets bewusst machen, dass er mit einem artifiziellen Substrat arbeitet und wo dessen Grenzen liegen. Deshalb sei an dieser Stelle explizit aufgeführt, in welchen Punkten Abweichungen vom natürlichen Sphingomyelin nicht vermieden werden konnten und welche möglichen Auswirkungen diese mit sich bringen.

#### 3-6-1 | Struktur und Ladung

Die hier vorgestellten ASM-Sonden weisen eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Sphingomyelin, dem natürlichen ASM-Substrat, auf. Besonders in einem Bereich von mindestens vier Bindungen um die zu hydrolysierende P-O-Bindung wurden sowohl die chemische Umgebung als auch die Stereochemie des Vorbilds exakt imitiert. Damit ist Sonde **2** Sphingomyelin deutlich ähnlicher als das synthetische Assay-Substrat HMUPC, welches bis *dato* in kommerziellen Sphingomyelinase-Assays eingesetzt wird. Im Gegensatz zur Struktur konnte die formale Ladung nicht perfekt nachgeahmt werden. Zwar befindet sich die entscheidende Bindung wie im natürlichen Sphingomyelin in direkter Nachbarschaft zu einer P-O<sup>-</sup>-Gruppierung, dennoch ist die Sonde anionisch. Trotz mehrerer Versuche konnten weder ein protonierbares tertiäres Amin noch eine quarternäre Ammonium-Gruppe in der Kopfgruppe der Sonden installiert werden um die Ladung zu kompensieren. Damit sind die hier vorgestellten Sonden im Gegensatz zu HMUPC nicht isoelektrisch zu ihrem zwitterionischen Vorbild Sphingomyelin. Die vorliegenden Daten (Kapitel 3-4) belegen jedoch, dass die FRET-Sonden dennoch als Substrat akzeptiert werden und dies sogar bei Anwesenheit des natürlichen Substrats (in den aLUVs). Demnach scheint eine positiv geladene funktionelle Gruppe für die Substraterkennung nicht obligatorisch zu sein. Ein ähnlicher Fall liegt beim eng

verwandten und vielfach eingesetzten NBD-Phosphatidylethanolamin (NBD-PtdE) vor, welches im Gegensatz zu seinem natürlichen zwitterionischen Vorläufer ebenfalls anionisch ist und dennoch ähnliches Verhalten in Lipiddoppelschichten zeigt.<sup>[106]</sup> Möglicherweise beruht dieser Befund auch auf dem günstigen Umstand, dass in NBD-PtdE und allen drei vorgestellten Sphingomyelin-Analoga ein NBD-Fluorophor einen großen Elektronensog auf das entscheidende Amin ausübt, sodass dieses einen partiell positiven Charakter erhält. Diese These wird durch Röntgenkristallstrukturanalysen gestützt, die diesem Stickstoffatom eine ungewöhnlich kurze Bindung von 1.332 Å zum aromatischen System zuweisen (siehe Abb. 3-50).

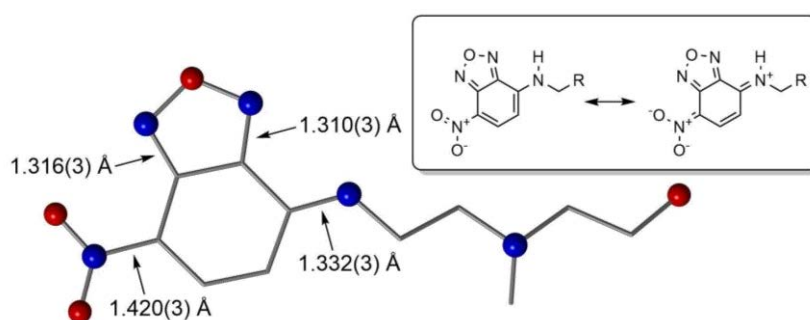


Abb. 3-50 | Röntgenkristallstruktur von **13** mit Angabe ausgewählter C-N-Abstände und Vorschlag einer mesomeren Alternativstruktur (Kasten) | Das NBD-Motiv, welches auch in der Kopfgruppe der Sonden **0-2** enthalten ist, zeigt im Vergleich zu Literaturwerten<sup>[174]</sup> (siehe Tab. 3-3) ungewöhnlich kurze Bindungen zwischen C<sub>ar</sub> und N(H)R bzw. NO<sub>2</sub>, die möglicherweise durch die im Einsatz gezeigte mesomere Grenzstruktur besser beschrieben werden: rot: O, blau: N, alle anderen: C, aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde H nicht abgebildet.

Tab. 3-3 | Ausgewählte, mittels Röntgenkristallstrukturanalyse experimentell ermittelte Bindungslängen | Für **13** relevante Einträge sind gelb markiert. Angegeben sind mittlerer Abstand  $d$ , Standardabweichung  $\sigma$ , unteres und oberes Quarztil  $q_u$  bzw.  $q_o$ . Exzerpt aus ALLEN *et al.*<sup>[174]</sup>.

Bindung	Substruktur	$d$	$\sigma$	$q_u$	$q_o$
C <sub>ar</sub> -N	C <sub>ar</sub> -NH-C#				
	(Nsp <sup>2</sup> : planar)	1.353	0.007	1.347	1.359
	(Nsp <sup>3</sup> : pyramidal)	1.419	0.017	1.412	1.432
	(overall)	1.380	0.032	1.353	1.412
	C <sub>ar</sub> -N-(C#) <sub>2</sub>				
	(Nsp <sup>2</sup> : planar)	1.371	0.016	1.363	1.382
	(Nsp <sup>3</sup> : pyramidal)	1.426	0.011	1.421	1.431
	(overall)	1.390	0.030	1.366	1.420
	C <sub>ar</sub> -NO <sub>2</sub>	1.468	0.014	1.460	1.476
Csp <sup>2</sup> =N	in Furoxanen	1.316	0.009	1.311	1.324

Ein Vergleich mit Literaturdaten<sup>[174]</sup> (siehe Tab. 3-3) zeigt, dass dieser Wert weniger für ein sp<sup>3</sup>- sondern vielmehr für ein planares sp<sup>2</sup>-hybridisiertes Stickstoffatom erwartet werden kann. Auch die Bindung des gegenüberliegenden Nitrosubstituenten zum

aromatischen Kohlenstoffatom ist vergleichsweise kurz. Beide liegen außerhalb eines  $\pm 3\sigma$  Intervalls um den Mittelwert, was bei einer Zufallsverteilung statistisch jeweils nur in einem von 370 Fällen vorkommt. Unter der Annahme eines unveränderten Protonenarrangements spricht dies für ein großes Gewicht der in Abb. 3-50 gezeigten Grenzstruktur. Die Ausbildung eines partiell chinoiden Systems macht auch die Fluoreszenzeigenschaften des Systems plausibel und liefert eine mögliche Erklärung für den Umstand, dass 4-Halogen-NBDs nicht, *O*- und *S*-Derivate kaum, aber *N*-Derivate dagegen intensive Fluoreszenz zeigen, der Trend also der mit der Stärke des +M-Effekts der Substituenten korreliert.<sup>[175]</sup>

Jede fluoreszente Markierung von Molekülen erfordert ein gewisses Maß an struktureller Modifikation. Die gezeigten Ergebnisse zeigen jedoch, dass die vorgenommenen Änderungen nur geringfügig sind, sodass die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten ASM-Sonden vom Enzym als Substrat akzeptiert werden. Zwar wurden bisher keine groben Abweichungen gefunden; aus Gründen der wissenschaftlichen Exaktheit dürfen die mit dem hier vorgestellten Assay experimentell ermittelten  $IC_{50}$ -Werte jedoch nicht ohne Verifizierung 1:1 auf das natürliche Substrat übertragen werden. Vielmehr ist dazu die Messung von  $K_m$ -Werten erforderlich.

### 3-6-2 | Mizellarer Assay

Die hier vorgestellten Sphingomyelin-Analoga sind, wie ihr natürliches Pendant, kaum in Wasser löslich. Da das Enzym eine Hydrolase ist, überrascht es kaum, dass seine Aktivität bislang nur in wässriger Lösung dokumentiert ist. Da sein Substrat jedoch nicht nur membranständig, sondern integraler Teil (10-25% der Gesamtmasse) der Membran ist, besitzt das funktionale Protein eine große Membranaffinität.<sup>[4]</sup> Um diese unterschiedlichen Aspekte in Einklang zu bringen, erfolgen Messungen der Aktivität, sowie die Aufreinigung des Enzyms in Anwesenheit eines Detergenz. Es ist jedoch bekannt, dass die Aktivität durch verschiedene Detergenzien (etwa Taurocholat) beeinflusst wird.<sup>[176]</sup> Dieser Aspekt bedarf deshalb besonderer Beachtung. Die Solubilisierung sowohl des Substrats als auch der funktionalen ASM zur Etablierung eines homogenen Assays in einem wässrigen Puffer erforderte die Einbettung der FRET-Sonden in Mizellen (wie in Vorarbeiten TX-100)<sup>[15,176,177]</sup> oder alternativ in Lipiddoppelschichten (Liposomen). Zwar ist die Präsentation der Sonde in liposomaler Formulierung deutlich ähnlicher zum natürlichen Arrangement, aufgrund seiner höheren Leistungsfähigkeit erhielt jedoch der

mizellare Assay den Vorzug. Es gilt zu beachten, dass das Vorhandensein von Mizellen und Liposomen zu einer Anreicherung lipophiler Substanzen auf einem Bruchteil des Gesamtvolumens führt. Es ist anzunehmen, dass sich die Sphingomyelin-Analoga **0-3** kaum frei in der Lösung bewegen und stattdessen auf die Mizellen beschränkt sind. Mithin tritt zwischen ihnen auch bei vergleichsweise geringer Konzentration eine stärkere Interaktion auf, als dies in einer wirklich homogenen Lösung derselben Konzentration zu erwarten wäre. Dies führt im Extremfall zur Ausbildung einer „2D-Lösung“ auf der Mizelloberfläche und beeinflusst die spektralen Eigenschaften der Analyten. Es wird berichtet, dass NBD-markierte Lipide bei Konzentrationen von >50 mol% eine fast vollständige Selbstlöschung (98%) zeigen. Darum wurde für den Assay eine möglichst geringe Substratkonzentration (1  $\mu\text{M}$ ) gewählt. Bei 30°C beträgt das mittlere Mizellgewicht einer TX-100 Lösung der verwendeten Konzentration von 0.1% (v/v) etwa 150 000 g mol<sup>-1</sup> und der Mizellradius etwa 6-10 nm.<sup>[178]</sup> Daraus folgt eine Mizellkonzentration <7  $\mu\text{M}$  in den verwendeten Puffern und mithin eine statistische Beladung von etwa einem Siebentel Sondenmolekül pro Mizelle. Die statistische Häufigkeit einer Doppelbeladung ist somit gering, weshalb intermolekularer FRET wohl eine untergeordnete Rolle spielt, obgleich der Mizellradius in der Größenordnung experimentell ermittelter FÖRSTER-Radien (1-10 nm) liegt.

### 3-6-3 | Charakterisierung des FRET-Paares

Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte *small-molecule* FRET-Sonde der ASM erlaubt erstmals eine mikroskopische Detektion der ASM-Aktivität. Im Gegensatz zur fluoreszenten Markierung des Enzyms selbst oder der radioaktiven Markierung seines Substrates wird nicht die bloße Anwesenheit der notwendigen Komponenten ermittelt, sondern ein Messwert für die Intaktheit des Substrates verwendet. Weil dieses Substrat ein Lipid und kein Protein ist, entfällt zudem die Möglichkeit, auf molekularbiologische Markierungsmethoden unter Verwendung von fluoreszierenden Proteinen zurückzugreifen. Stattdessen wird ein maßgeschneidertes und wohldefiniertes kleines Molekül eingesetzt, dass zuvor eingehend spektroskopisch charakterisiert werden konnte. Häufige Probleme wie unvollständige oder doppelte Markierung des beobachteten Biomoleküls können so vermieden werden, sodass ein reines 1:1-FRET-Paar verwendet werden kann. Auf die Angabe exakter Quantenausbeuten oder absoluter Interfluorophorabstände wurde verzichtet. Dies ist vor allem dem anwendungsorientierten Ansatz und dem speziellen

Reaktionsmedium geschuldet. Da sowohl in mizellarer Lösung als auch *in cellulo* der lokale Brechungsindex und die effektive Quantenausbeute der Fluorophore nicht mit der angemessenen Sicherheit bestimmt werden können, war es auch nicht im Sinne wissenschaftlicher Genauigkeit, einen absoluten FÖRSTER-Radius  $R_0$  oder die Helligkeit der Fluorophore in diesen Systemen zu berechnen. Die Messung dieser Werte in homogener Lösung (etwa in Methanol-Wasser-Gemischen) erscheint prinzipiell möglich, jedoch wurde aufgrund der geringen Übertragbarkeit auf ein funktionales *setting* (ASM-kompatibler Puffer, Zellumgebung) darauf verzichtet. Dieses Manko ist allen Studien inhärent, die sich vom einfachen Modellsystem in homogener Lösung entfernen. Aufgrund der Stetigkeit der Funktion  $E(R)$  kann jedoch eine relative Aussage bezüglich der Nähe der beiden FRET-Partner getroffen werden (*proximity indicator*). Im hier vorgestellten Fall der Untersuchung der ASM-Aktivität heißt das, dass je aktiver ein ASM-Präparat ist, desto rascher entfernen sich Donor und Akzeptor und desto schneller verringert sich der FRET. Unter Verwendung geeigneter Kontrollexperimente kann so etwa die Aktivität von Enzympräparationen auch ohne vollständige Charakterisierung des verwendeten Fluorophor-Paares ermittelt werden.

Ein besonderer Fall liegt hier insbesondere deshalb vor, weil ein kovalent verbundenes FRET-Paar an einem vergleichsweise kleinen Molekül untersucht wird. Dies gilt speziell unter dem Blickwinkel, dass es sich um ein membranständiges Molekül handelt, in dem die Fluorophore 40% der Gesamtmasse des Moleküls ausmachen und folglich die Lipophilie und den sterischen Anspruch des Moleküls stark beeinflussen. Infolgedessen kann der Donor nicht isoliert vom Akzeptor vermessen werden, da der Akzeptor wesentlichen Einfluss auf die lokale Umgebung des Donors hat. Dieser Erkenntnis folgend, kann es nicht zum Ziel führen, den dominanten Einfluss der lokalen Umgebung auf das Ansprechverhalten der FRET-Sonden zu verringern; er muss im Gegenteil bestenfalls nutzbar gemacht werden. Dazu wurde in dieser Arbeit das Konzept der Phasentrennungs-gestützten Signalverstärkung (PS) einer FRET-Sonde entwickelt und seine Anwendbarkeit mit der Synthese von Sonde **2** erfolgreich demonstriert.

### 3-6-4 | Mikroskopie

Im Zuge der mikroskopischen Studien erwies es sich als Herausforderung, die Hydrolyse der FRET-Sonde **2** trotz suboptimaler apparativer und präparateigener Gegebenheiten zu

verfolgen. Zum einen bereitete *bleed-through*<sup>f</sup> Probleme bei der selektiven Detektion der beiden Fluorophore, zum anderen ein relativ starker Hintergrund, der zudem nicht konstant über die gesamte Zelle war. Der Fakt, dass an den *lipid beads* kein derartiger Hintergrund beobachtet wird, deutet darauf hin, dass er das Resultat von Autofluoreszenz einiger Zellbestandteile (z.B. NADH) ist. Hinzu kam, dass der zur Verfügung stehende Filtersatz die Detektion der MCC-Fluoreszenz nicht am Maximum, sondern nur an einer Schulter gestattete und so die Empfindlichkeit einschränkte. Beides macht eine Verschiebung von Anregungs- und Emissionsmaximum des Donors zu größeren Wellenlängen erstrebenswert; ein Ziel das durch Modifikation des Fettsäurerests der Sonde synthetisch leicht möglich scheint. Ein Blick auf die gemessenen Spektren zeigt, dass die spektrale Überlappung der Donoremission und der Akzeptorabsorption dadurch sogar zunehmen könnte, was sich in einer zusätzlichen Steigerung der FRET-Effizienz niederschlagen sollte. Zudem wurde der hier verwendete Fluorophor MCC ohne Kenntnis seines Zweiphotonenwirkungsquerschnitts  $\sigma_2$  aus Gründen der schnellen synthetischen Zugänglichkeit als FRET-Donor verwendet. Darum könnte ein Austausch des Donors auch zu gesteigerter Zweiphotonenanregung und mithin zu einer empfindlicheren Detektion führen.

Die Relevanz von Studien zur ASM-Aktivität in der lebenden Zelle wird durch den Befund unterstrichen, dass ASM-KO-Zellen neben der beabsichtigten Abwesenheit der ASM noch weitere Unterschiede zu den WT-Zellen aufweisen. So wachsen sie deutlich schneller und weisen morphologische Unterschiede (Zelloberfläche, Vesikeldichte) auf, die einen Vergleich der Zelllinien erschweren. Anders als im ASM-Assay, wo Lysate von KO-MEFs keine Aktivität zeigen, scheint die Trennung des FRET-Systems in der intakten Zelle nicht alleinig vom Vorhandensein der ASM abzuhängen. So zeigten ASM-defiziente KO-MEFs zwar, dass die NBD-haltige Kopfgruppe in unpolarer Umgebung akkumuliert wird, jedoch wird trotzdem MCC-Ceramid gemeinsam mit weiteren MCC-haltigen Abbauprodukten generiert. Dies erschwert die Verfolgung des konstitutiven Abbaus durch die ASM. Diesen alternativen Katabolismus zu untersuchen, könnte neue Erkenntnisse zur Pathogenese der NIEMANN-PICK-Erkrankung liefern.

---

<sup>f</sup> Unvollständige Separation der Emission: Fluorophor A trägt zum Signal des zur Detektion von B verwendeten Kanals bei.



## 4 | Zusammenfassung

Die saure Sphingomyelinase (ASM) ist eine von mehreren Lipasen, die die Hydrolyse des Phospholipids Sphingomyelin zu Phosphorylcholin und Ceramid katalysieren. Zwar ist ihre Rolle im konstitutiven Abbau des Membranbestandteils Sphingomyelin und der erblichen NIEMANN-PICK-Erkrankung gut verstanden, jedoch weist ihr aktuelles Wirkmodell offene Punkte in Bezug auf ihre Beteiligung an der Signalübertragung mittels Lipid-Botenstoffen, dem sogenannten *lipid signaling*, auf. Es ist unstrittig, dass das Hydrolyseprodukt Ceramid ein potenter Modulator antiproliferativer Prozesse ist, dessen Konzentration unmittelbar von der Aktivität der ASM abhängt. Folglich bildet eine pharmakologische Regulation der ASM einen interessanten Ansatzpunkt zur Beeinflussung nachgelagerter physiologischer Effekte, die mit verschiedenen Erkrankungen (akutes Lungenversagen, Entzündungen, Krebs) in Verbindung gebracht werden. Der Umstand, dass die Aktivität der ASM durch ein kompliziertes Zusammenspiel aus post-translationaler Prozessierung, Induktion, Sekretion und pH-Modulation fein reguliert ist, erschwert jedoch Aussagen über ihren tatsächlichen Beitrag zur Ceramid-Bildung an verschiedenen Orten in der lebenden Zelle. Zudem ist trotz jahrzehntelanger Forschung selbst die Untersuchung der Reaktion *in vitro* anspruchsvoll, da bislang kein homogener Assay der ASM-katalysierten Hydrolyse von Sphingomyelin zur Verfügung steht. Maßgeschneiderte Moleküle und Methoden auf Basis der Fluoreszenzmikroskopie stellen eine Möglichkeit dar, diesen biochemischen Vorgang zu studieren. Folglich sollte mit der Synthese einer FRET-Sonde der sauren Sphingomyelinase der molekularbiologische Werkzeugkasten zur Untersuchung dieses Enzyms und des Lipidstoffwechsels weiterentwickelt werden.

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit fluoreszierende Sphingomyelin-Analoga dargestellt (**0-2**) und deren Eignung als Substrat der ASM untersucht. Dabei lag der Schwerpunkt auf zweifach fluoreszent markierten Sonden (**1, 2**), die durch FÖRSTER-Resonanzenergietransfer eine Aussage über das Ausmaß der ASM-Aktivität und den Verbleib der fluoreszierenden Folgeprodukte (**3-5**) liefern.

Die Darstellung der Sphingomyelin-Analoga (siehe Abb. 4-1) gelang ausgehend von L-Serin in 4-17% Ausbeute über dreizehn lineare Stufen. Schlüsselschritte dabei waren eine stereoselektive Reduktion eines vom Serin abgeleiteten MICHAEL-Systems, eine

Olefin-Kreuzmetathese und die Generierung eines asymmetrischen Phosphodiesters mittels Phosphorodichloridat-Chemie. Durch die Anbringung ausgewählter Fluorophore an dem so gewonnenen Intermediat (NBD, NBD/NR, NBD/MCC) wurden fluoreszierende Sphingomyelin-Analoga erhalten. Durch eine Abwandlung der Syntheseroute wurden auch die korrespondierenden markierten Ceramide dargestellt. Die gezeigten Verbindungen wurden mittels NMR- und UV/Vis-Spektroskopie, sowie Massenspektrometrie charakterisiert.

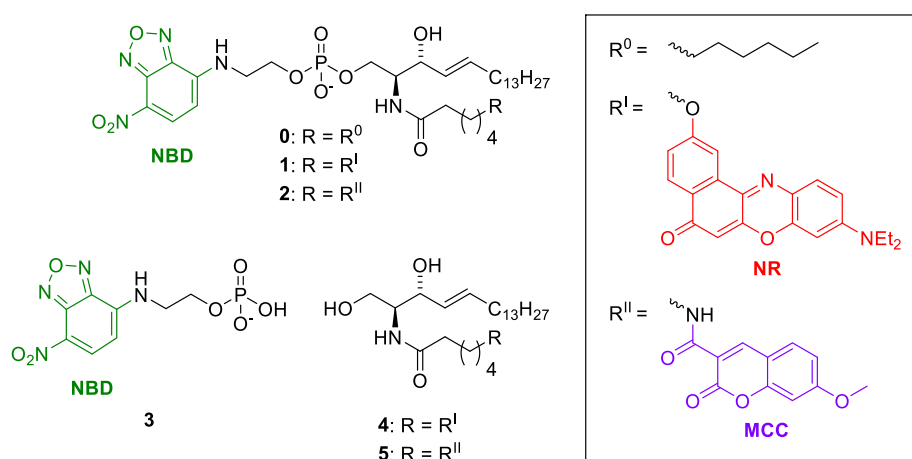


Abb. 4-1 | Im Rahmen dieser Arbeit dargestellte Verbindungen | oben: Sphingomyelin-Analoga **0-2**, unten: zugrundeliegendes NBD-Aminoethylphosphat **3**, sowie die korrespondierenden Ceramid-Analoga **4** und **5**. Die Verbindungen **1** und **2** zeigen durch duale Fluoreszenzmarkierung (NBD/NR bzw. NBD/MCC) FÖRSTER-Resonanzenergietransfer (FRET) und sind Substrate der sauren Sphingomyelinase (ASM).

Anhand des Sphingomyelin-Analogons **1** konnte in ersten Versuchen nachgewiesen werden, dass FRET von NR zu NBD stattfindet, dass die Verbindung von ASM erkannt und hydrolysiert wird und dass beides eine zeitliche Verfolgung der Reaktion mittels Fluoreszenzspektroskopie erlaubt. Die Leistungsfähigkeit der damit etablierten FRET-Sonde der ASM ließ jedoch Verbesserungspotential. Im Verlauf der Arbeiten wurden, neben kritischen strukturellen Parametern für die Substraterkennung, große Einflüsse der lokalen Umgebung auf die Fluoreszenzeigenschaften der untersuchten Verbindung gefunden. Die nähere fluoreszenzspektroskopische Charakterisierung dieses Phänomens lieferte wertvolle Einblicke in die Interaktion der Fluorophore mit ihrer Mikroumgebung, die ihre Eignung in der spektroskopischen Anwendung maßgeblich beeinflussen. Auf der Basis dieser Erkenntnisse wurde das Konzept der Phasentrennungsgestützten Signalverstärkung (PS) von FRET-Sonden entwickelt und mit der Synthese einer 30-mal leistungsfähigeren zweiten Generation **2** der vormals mäßig effektiven FRET-Sonde **1** praktisch umgesetzt. Dazu wurde der Fluorophor NR, welcher in **1** noch als

FRET-Akzeptor diente, in **2** gegen MCC ausgetauscht, wodurch der im Molekül verbliebene vormalige Donor NBD die Funktion eines FRET-Akzeptors erhielt (siehe Abb. 4-1).

Unter Verwendung der verbesserten Sonde **2** konnte eine Methode etabliert werden, um die ASM-Aktivität mittels Fluoreszenzspektroskopie in einem homogenen oder liposomalen Assay ohne zeitliche Verzögerung zu messen. Dies erlaubte die Bestimmung relativer Aktivitäten rekombinanter humaner ASM aus Sf21-Insektenzellen, sowie aus Lysaten von HeLa-Zellen und murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs). Durch weitere Tests unter Verwendung von Lysaten ASM-defizienter und wildtypischer MEF-Zellen wurde eine vollständige, spezifische, konzentrations- und pH-abhängige Hydrolyse der Sonde **2** durch ASM nachgewiesen. Dabei erfolgte ausschließlich unter den von ASM bevorzugten Bedingungen eine Reaktion. Auch die konzentrationsabhängige Inhibition der Reaktion durch einen Inosit-basierten Inhibitor konnte gezeigt werden. Damit wurde ein robustes biochemisches Werkzeug zur Untersuchung der ASM-Aktivität etabliert, welches sich besonders zum *screening* nach ASM-Inhibitoren eignet.

Die Leistungsfähigkeit der Sonde **2** erlaubt zudem auch Studien mittels Fluoreszenzmikroskopie. Das Konstrukt aus MCC und NBD erwies sich dabei als empfänglich für eine Zweiphotonenanregung (2PE), was eine schonende Bildgebung in lebenden Zellen erlaubt und prinzipiell auch in Gewebeschnitten ermöglicht. Zunächst wurde die ASM-Sonde **2** in magnetische *lipid beads* inkorporiert, wo durch Photobleichungsexperimente eine hohe FRET-Effizienz in einer Lipidumgebung nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigt die Verbindung auch in der lebenden Zelle FRET. Sie wird in kultivierte adhärente MEF-Zellen aufgenommen und nach Art einer *memory probe* zu fluoreszierenden Folgeprodukten verstoffwechselt. Wie erwartet, wird dabei MCC-Ceramid gebildet. Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Verfolgung der Fragmente und die Detektion der ASM-Aktivität *in cellulo*. Anschließende Studien an verschiedenen MEF-Zelllinien erlaubten eine Unterscheidung ASM-defizienter und wildtypischer Zellen anhand ihres Erscheinungsbildes und bildeten die vermehrte ASM-Expression nach Lipofektion eines ASM-codierenden Plasmids korrekt ab. Entgegen der Ergebnisse des homogenen Assays wird auch in KO-MEFs über einen bislang ungeklärten alternativen Abbaupfad MCC-Ceramid gebildet. Die Resultate unterstreichen die Wichtigkeit von Messungen in der lebenden Zelle, die mit dem hier vorgestellten biochemischen Werkzeug erstmals möglich sind.



## 5 | Ausblick

Im Lichte der gewonnenen Erkenntnisse zeigen sich verschiedene Anknüpfungspunkte für weiterführende Arbeiten. Dazu gehören ASM-*in-vitro*-Assays, zwei- und dreidimensionale Mikroskopie unter ASM-Stimulation, die Optimierung der Darreichung (*delivery*) der Sonden, sowie deren Weiterentwicklung mittels chemischer Synthese einer dritten Generation der Sonde unter Nutzung des hier vorgestellten Konzepts zur Phasentrennungs-gestützten Amplifikation des FRET-Signals (PS).

Die naheliegendste Fortführung der in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Arbeiten liegt in der Übertragung des etablierten Assays auf ein Mikrotiterplattenformat. Erste, vorläufige Ergebnisse belegen die prinzipielle Übertragbarkeit der in Küvetten erzielten Ergebnisse auf das miniaturisierte, parallelisierte Format. Mit dessen Hilfe könnten anschließend auch größere Substanz-Bibliotheken auf mögliche ASM-Inhibitoren untersucht werden. In Verbindung mit der hier vorgestellten Sonde **2** ist so erstmals auch eine kontinuierliche Beobachtung der Reaktion in einem homogenen Assay möglich, wodurch grundsätzlich auch der Effekt von später zugegebenen Agenzien ohne Mehraufwand studiert werden kann. Die Möglichkeit, die Bildung beider Reaktionsprodukte auf zwei getrennten spektralen Kanälen parallel mit weit verbreitetem Equipment zu verfolgen, stellt eine signifikante Erweiterung des verfügbaren Methodenarsenals dar.

Neben Sonde **2** kann auch die synthetisch weit weniger anspruchsvolle Sonde **0**, die neben der NBD-Kopfgruppe keinen weiteren Fluorophor trägt, für ASM-Assays mit einem reduzierten Funktionsumfang eingesetzt werden. Es scheint formal möglich, eine zu **0** homologe Sonde in nur einem synthetischen Schritt aus kommerziell erhältlichem 2-Ammonioethyl-[(2*R*,3*S*,*E*)-2-dodecanamido-3-hydroxyheptadec-4-enyl]phosphat und NBDCl zu gewinnen. Falls es gelänge, aufbauend auf dieser Verbindung funktionale ASM-Assays zu entwickeln, stünde ihrem Einsatz auch in weniger syntheseerprobten Laboren nichts entgegen. Dies stellt eine interessante Chance dar, die Methode einer breiten Forschergemeinde zugänglich zu machen, ohne das benötigte Substrat notwendigerweise bereitstellen zu müssen. Möglicherweise bietet sich so die Gelegenheit, die nach wie vor sehr gebräuchlichen radioaktiven ASM-Assays zu ergänzen oder zu ersetzen.

Aufgrund ihres anionischen Charakters sind die hier entwickelten Sonden bislang nicht membranpermeabel. Deshalb lagern sie sich vielmehr nach Zugabe ins Medium schnell in

die äußere Zellmembran ein und gelangen offenbar durch Endozytose in das Zellinnere. Letzterer Prozess vollzieht sich sehr langsam und erschwert die zeitliche Verfolgung der Sondenhydrolyse unter dem Mikroskop. Darum stellt die Optimierung der Aufnahme der Sonde in Zellen eine naheliegende Fortführung der hier vorgestellten Sonde dar. Dies kann mit Hilfe chemischer Modifikationen erzielt werden, die jedoch mit erheblichem Zeit- und Materialaufwand verbunden sind, weshalb zunächst alternative Ansätze untersucht werden sollten, um das unmodifizierte Sondenmolekül mittels Hilfsstoffen in die Zellen zu schleusen. Dazu existieren mehrere denkbare Varianten die sich von Verfahren für die Transfektion von DNS und RNS und den natürlichen Lipidtransportmechanismen ableiten. Besonders vielversprechend und teilweise im Rahmen dieser Arbeit bereits angetestete Verfahren sind:[169,179,180]

- a) Komplexierung, z.B. mit BSA, LDL,  $\text{Ca}^{2+}$ , kationischen Dendrimeren/Polymeren, die zur Transfektion (ebenfalls anionischer) Biomoleküle (SM, DNS, RNS) etabliert sind.
- b) Liposomaler Einschluss, z.B. in verschieden geladene LUVs oder verschachtelte *multilamellar vesicles* (MLV), deren Fracht ASM erst nach Endozytose zugänglich ist.
- c) Inkorporation in *virus-like particles* (VLP), die zur Transfektion und Darreichung von Biomolekülen eingesetzt werden.

Alternativ kann durch chemische Modifikation eine Entfernung oder Maskierung der permeationshemmenden funktionellen Gruppen die Aufnahme einer Verbindung in Zellen erhöht werden. Da die negative Ladung des Phosphodiesters der Sonde aber nach bisherigem Kenntnisstand notwendig für eine effiziente Substraterkennung ist, kann sie nicht weggelassen, sondern lediglich unter Verwendung reversibler Schutzgruppen temporär maskiert werden. Dazu könnten sich unter sorgfältiger Prüfung der Kompatibilität zu den vorhandenen Fluorophoren biolabile Phosphatschutzgruppen wie *S*-Acetyl-2-thioethyl- (SATE)<sup>[135]</sup> oder Acetoxymethyl- (AM)<sup>[181]</sup> sowie *photocages* wie 4-Bromo-5-hydroxy-2-nitrobenzhydryl- (BHNB)<sup>[157]</sup> eignen.

Zusätzlich könnte es von Vorteil sein, einzelne hydrolysierbare funktionelle Gruppen (Phosphorsäureester, Amide) durch weniger enzymlabile bioisostere Analoga (Phosphonsäureester, Alkylamide) zu ersetzen. Auf diese Weise könnten Reaktionen unterbunden werden, die mit der ASM-vermittelten Trennung des FRET-Paares konkurrieren oder ihr nachfolgen, was eine selektivere Beobachtung des interessierenden Prozesses erlauben sollte.

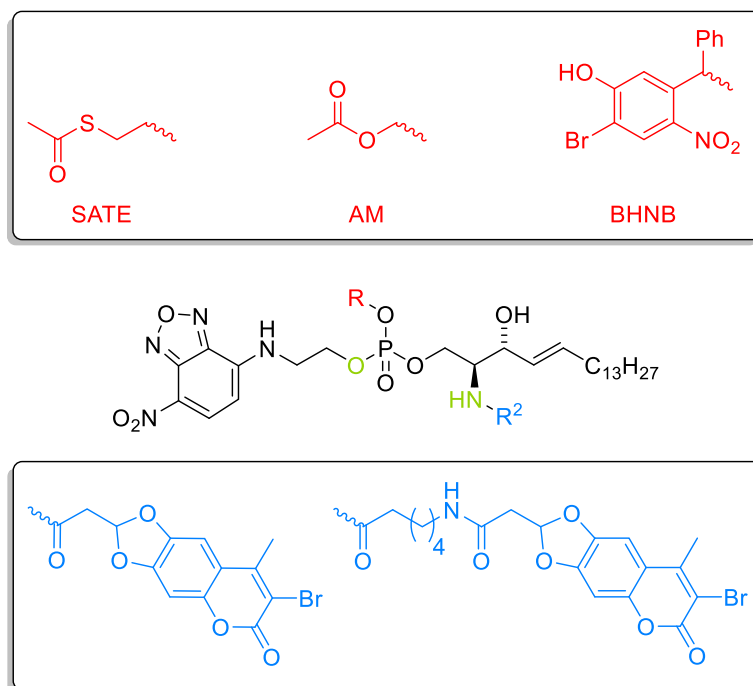


Abb. 5-1 | Vorschläge zur Weiterentwicklung der in dieser Arbeit vorgestellten ASM-FRET-Sonde **2** durch  
**A** | die Maskierung des Phosphats (rot) zur Optimierung der Applikation der Sonde und/oder  
**B** | den bioisosteren Austausch enzymlabiler funktioneller Gruppen (grün) und/oder  
**C** | die Modifikation des FRET-Donors (blau) zur Vergrößerung des Zweiphotonenwirkungsquerschnittes  $\sigma_2$ .

Zudem liegt die Weiterentwicklung von Sonde **2** unter Nutzung der in dieser Arbeit entwickelten experimentellen Protokolle und des Konzepts der Signalverstärkung von FRET-Sonden durch Phasentrennung nahe. Dazu könnte das MCC-Fluorophor gegen ein kürzlich von der Arbeitsgruppe WESSIG vorgestelltes Bromocumarin<sup>[123]</sup> ersetzt werden. Damit könnte eine Verbesserung in mehreren Punkten erreicht werden, nämlich ein höherer Zweiphotonenwirkungsquerschnitt  $\sigma_2$ , sowie eine nochmals vergrößerte FRET-Effizienz  $E$  durch größere Überlappung mit der Absorptionsbande des Akzeptors. So ließe sich vermutlich durch eine gegenüber Sonde **2** um etwa 20 nm rotverschobene Fluoreszenz des FRET-Donors eine empfindlichere Detektion des Ceramid-analogen Reaktionsproduktes mit den verfügbaren Mikroskopfiltersätzen erzielen. Erste Tests zeigten, dass das Molekül analog der Sonden **1** und **2** aus dem zentralen Intermediat **51** gewonnen werden kann. Es zeigt ebenfalls FRET und wird von rekombinanter ASM als Substrat akzeptiert. Damit könnte auch eine 3D-aufgelöste ASM-Detektion in Geweben in den Bereich des Machbaren rücken, denn aufgrund ihrer großen Eindringtiefe ermöglicht die hier eingesetzte 2PE-Mikroskopie potenziell auch die Untersuchung dünner Gewebeschnitte.





## 6 | Experimenteller Teil

### 6-1 | Reagenzien & Lösungsmittel

Die verwendeten Lösungsmittel und Reagenzien wurden von Acros (Geel, Belgien), Merck (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (St. Gallen, Schweiz), TCI (Zwijndrecht, Belgien), ABCR (Karlsruhe, Deutschland), Biochrom (Berlin, Deutschland), Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) und Alfa Aesar (Ward Hill, USA) erworben. Technische Gase (Argon 5.0, H<sub>2</sub> und CO<sub>2</sub> in Lebensmittelqualität) lieferte Air Liquide (Paris, Frankreich). Reinstwasser lieferte eine Astacus-Einheit von MembraPure (Bodenheim, Deutschland). Deuterierte Lösungsmittel wurden von Armar (Doettingen, Schweiz) erworben. Die Lösungsmittel wurden unter Verwendung geeigneter Trocknungsmittel nach Standardmethoden von Wasser befreit. Sofern nicht anderslautend beschrieben wurden alle Reaktionen an Luft unter Normalbedingungen durchgeführt.

### 6-2 | Puffer & Medien

ASM-Puffer: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100

NSM-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% TX-100

Lysepuffer: 0.2 M Sucrose, Proteaseinhibitor-Cocktail ohne EDTA

Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 7.6, 1 M NaCl, 0.1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 0.4%  $\beta$ -OG (w/v)

Kulturmedium: DMEM mit Phenolrot, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin

Bildmedium: DMEM ohne Phenolrot, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin

## 6-3 | Zellkultur & Präparate

### 6-3-1 | Zellkultur

Adhärente HeLa-Zellen, WT- oder ASM-KO-MEF-Zellen wurden in 25 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in Kulturmedium (siehe oben, mit Phenolrot) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Zellsplitting wurden die (konfluenten) Zellen 2x mit PBS<sup>-/-</sup> gewaschen, mit 500 µL Trypsin/EDTA überschichtet und 3 min bei 37°C trypsiniert. Durch Klopfen wurden die Zellen vom Schalenboden gelöst und das Trypsin durch Zugabe von 2.5 mL Kulturmedium inaktiviert. Die Zellen wurden gleichmäßig suspendiert, 1/12 des Volumens (250 µL) in eine neue Kulturflasche überführt, mit 6 mL neuem Kulturmedium aufgefüllt und weiter inkubiert. Für Mikroskopie zwecke wurde je 1/12 der Zellsuspension (250 µL) in 35 mm-MatTek-Glasbodenschalen gefüllt und mit Imagingmedium zu 2 mL ergänzt oder 1/20 des Volumens (150 µL) in ibidi µ-slides<sup>VI</sup> gefüllt und das Volumen zu 230 µL ergänzt. Die verschlossenen Kulturgefäße wurden erneut inkubiert.

### 6-3-2 | Transiente Lipofektion

Adhärente Zellen wurden in 2 mL Kulturmedium kultiviert wie unter Abschnitt 6-3-1 beschrieben. Pro Schale erfolgte die Transfektion durch die Abfolge folgender Schritte:

- a) In einem PE-Mikroreaktionsgefäß werden 150 µL OptiMEM und 5 µL Lipofectamin 2000 gemischt.
- b) In einem PE-Mikroreaktionsgefäß werden 150 µL OptiMEM und 2.5 µg Plasmid (pSV-Sport WTASM 2012, bereitgestellt von Frau S. DIEDERICH).
- c) Das Lipofektamin-haltige Medium wird gut gemischt und zum Plasmid-haltigen Medium gegeben, gemischt und 25 min bei RT inkubiert.
- d) Die so erhaltenen Lipofektamin/Plasmid-Komplexe werden in das Zellmedium pipettiert und die Zellen anschließend normal (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) weiterkultiviert.

Zur Kontrolle wurde jeweils auch einmal mit reinem Wasser anstelle des Plasmid-haltigen Puffers transfiziert. Die Arbeiten erfolgten durch Frau L. MARONGIU.

### 6-3-3 | Zelllyse

Zur Gewinnung von Zelllysaten wurde der Inhalt zweier 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen mit je 2x PBS<sup>-/-</sup> gewaschen, die Zellen trypsiniert, und das Trypsin durch Zugabe von 5 mL farblosem DMEM mit 10% FCS inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein PE-Schraubgefäß überführt und mit 4000 U/min für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und der Bodensatz in 1 mL PBS resuspendiert. Es folgte erneute Zentrifugation mit 3000 U min<sup>-1</sup> für 5 min bei 4°C. Der Überstand wurde entfernt und der Bodensatz in 325 µL 0.4 M aq. Sucrose und 325 µL doppelt konzentrierter Proteaseinhibitor-Stammlösung suspendiert. Die Suspension wurde 5-10 min bei 4°C im Ultraschallbad lysiert. Die Gesamtproteinkonzentration wurde kolorimetrisch mittels Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)) bestimmt. Die Lysate wurden auf Eis gelagert und zur längeren Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C aufbewahrt. Die Lysate wurden von Frau L. MARONGIU zur Verfügung gestellt.

### 6-3-4 | ASM-Präparation

Wie beschrieben durch LANSMANN *et al.*<sup>[2]</sup> wurde humane saure Sphingomyelinase (ASM) aus Sf21-Insektenzellen exprimiert und zur Homogenität gereinigt. Das in Gegenwart von 0.1 mM Zn<sup>2+</sup> aufgereinigte Enzym wies im kommerziellen mizellaren Assay eine Aktivität von 23 nmol h<sup>-1</sup> mL<sup>-1</sup> auf. Die Arbeiten erfolgten durch Frau S. DIEDERICH.

### 6-3-5 | Liposomenpräparation

1 µmol Lipidmix (10 mol% Sphingomyelin (SM), 40 mol% Phosphatidylcholin (PC), 20 mol% Cholesterol, 20 mol% Natrium-3-*sn*-phosphatidat (PA) aus Eigelb und 10 mol% **2** oder **5**) wurde in silikonisierten Mikroreaktionsgefäßen zusammengegeben und im Luftstrom eingengt. Der Rückstand wurde in 500 µL Tris/HCl (2 mM, pH 7.4) rehydratisiert und für 1 min auf dem Vortexmischer geschüttelt. Die Mischung wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im Inkubator auf 37°C erwärmt; dieser Prozess wurde sechsmal wiederholt und anschließend erneut 1 min auf dem Vortexmischer geschüttelt. Die Suspension wurde mithilfe eines Mini Extruders (Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, Alabama, USA) 21-mal durch eine Polycarbonat-Membran (Porendurchmesser: 100 nm) gepresst und das so erhaltene Präparat (2 mM final) bei 4°C dunkel gelagert.

### 6-3-6 | Präparation von *lipid beads*

Frisch präparierte Liposomen (100  $\mu\text{L}$ ) wurden mit dem gleichen Volumen einer 10 mg mL<sup>-1</sup> Suspension *magnetic silica beads* S 1.0 Ø 1  $\mu\text{m}$  (PR-MAG00001-02, MoBiTec GmbH, Göttingen, Deutschland) gemischt und 1 h bei RT inkubiert. Mittels Magnetseparation wurden die *beads* vom Überstand getrennt, und mit halbkonzentriertem PBS gewaschen. Anschließend wurden die *beads* in halbkonzentriertem PBS resuspendiert (200  $\mu\text{L}$ ) und bei 4°C dunkel gelagert.

### 6-3-7 | BSA-Komplexierung

In 1 L DMEM wurde HEPES gelöst (10 mM final). In einem Aliquot davon wurde eine 312  $\mu\text{M}$  Stammlösung von entfettetem BSA hergestellt. 250 nmol der zu komplexierenden Verbindung in DMSO wurden mit EtOH auf 200  $\mu\text{L}$  verdünnt und gut gemischt. 800  $\mu\text{L}$  BSA-Stammlösung wurde zugegeben und die Lösung bei 37°C für 30 min vor Licht geschützt auf dem Rütteltisch inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in einen Dialyseschlauch überführt. Dieser wurde verschlossen und für 24 h im HEPES-Puffer unter Lichtausschluss dialysiert. Der Inhalt des Dialyseschlauchs wurde danach in Mikroreaktionsgefäße überführt und unter Lichtausschluss gefriergetrocknet. So gewonnene BSA-Komplexe wurden bis zur Nutzung bei -20°C dunkel gelagert.

## 6-4 | Chromatographie

### 6-4-1 | Analytische Dünnschichtchromatographie

Dünnschichtchromatographie (DC) erfolgte an Silicagel 60 Aluminiumplatten F254 (Merck (Darmstadt, Deutschland)). Angaben zur Laufmittelzusammensetzung sind grundsätzlich in Volumenteilen (v/v) angegeben. Sofern nicht anderslautend beschrieben beziehen sich  $R_f$ -Werte auf analytische Trennungen an einer stationären Silica-Phase auf einer Laufstrecke von etwa 3.5 cm. Die Detektion der Analyten erfolgte mit UV-Licht (254 nm/366 nm) oder mittels geeigneter Tauchreagenzien (Ninhydrin-Färbung: 3% (m/m) in EtOH, SEEBACH-Färbung: 25 g MoO<sub>3</sub>·H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 10 g Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·4 H<sub>2</sub>O, 60 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und 905 mL H<sub>2</sub>O, 4-Anisaldehyd-Färbung: 1% (m/m) in EtOH:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 50:1 oder Vanillin-Färbung: 3% (m/m) in EtOH:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> = 200:1) nach Erwärmung.

### 6-4-2 | Präparative Dünnschichtchromatographie

Präparative DC erfolgte auf Silicagel 60 Glasplatten 20 cm x 20 cm mit Konzentrationszone (Merck (Darmstadt, Deutschland)). Produkthaltige Banden wurden abgeschabt, mit dem verwendeten Laufmittel extrahiert und gefiltert (0.45 µm). Bindemittelreste wurden entfernt, indem eine Lösung der Verbindung in reinem Methanol mehrfach mit 2,2,4-Trimethylpentan gewaschen wurde.

### 6-4-3 | Präparative Säulenchromatographie

Sofern nicht anderslautend angegeben, diente Silicagel 60 (0.040–0.063 mm) von Macherey-Nagel (Dueren, Deutschland) als stationäre Phase in der präparativen Säulenchromatographie. Die anschließende Abtrennung des Lösungsmittels erfolgte unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer bei 40–45°C Wasserbadtemperatur.

### 6-4-4 | Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

HPLC-Messungen erfolgten an einem 1290 Infinity Series System (Agilent Technologies, Santa Clara, US) unter Verwendung einer Zorbax RRHD C18 Eclipse Plus 2.1x50 mm, 1.8 Micron Säule, eines UV/Vis Detektors und entweder eines FLD oder eines Agilent 6120 Quadrupol LC/MS (ESI<sup>+/·</sup>). Soweit nicht anderslautend beschrieben, erfolgte HPLC-MS-Analyse unter Nutzung von Solvent A (99.9% H<sub>2</sub>O + 0.1% FA) und B (99.9% MeOH + 0.1% FA) mit Gradient 1 (5% B in A bis 95% B in A in 2 min) oder isokratisch (85% B in A) mit einer Flussrate von 0.6 mL min<sup>-1</sup> bei 20°C.

## 6-5 | Spektroskopie

### 6-5-1 | Kernmagnetische Resonanz-Spektroskopie (NMR)

NMR-Spektren (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, APT, und <sup>31</sup>P) wurden in CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, CD<sub>3</sub>CN, D<sub>2</sub>O, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, (CD<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Si oder Mischungen derselben am AvanceDPX-300, AvanceII-300, Avance400, AvanceIII-500 oder Avance600 der Firma Bruker (Rheinstetten, Deutschland) bei 25°C aufgenommen. Die chemische Verschiebung  $\delta$  bezüglich TMS (<sup>1</sup>H, APT, <sup>13</sup>C,  $\delta$  = 0.00) ist in ppm angegeben. Eine Kalibration erfolgte gegen das Restprotonensignal des Lösungsmittels,<sup>[182]</sup> internes TMS oder externe 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (<sup>31</sup>P,  $\delta$  = 0.00). Sofern möglich, wurden

die Kopplungspartner den Kopplungskonstanten  $J$  durch hochgestellte Elementsymbole zugeordnet und der Übersichtlichkeit halber für Kopplungen zu Protonen nicht angegeben. Den einzelnen Signalen wurden Strukturelemente zugeordnet, in uneindeutigen Fällen ist zur Unterscheidung das Atom des betrachteten Signals kursiv gedruckt. Die Messungen erfolgten eigenhändig oder durch Frau A. THIESIES bzw. Frau K. PFAFF.

### 6-5-2 | Hochaufgelöste Massenspektrometrie (HRMS)

Hoch aufgelöste Massenspektren (HRMS) lieferte ein LTQ FT UltraTM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die Ionisation erfolgte durch Elektrospray-ionisation (ESI). Die Messungen erfolgten durch Frau A. WOYDA.

### 6-5-3 | Röntgenkristallstrukturanalyse

Röntgenbeugungsexperimente an geeigneten Einkristallen wurden unter N<sub>2</sub>-Kühlung mittels Röntgenstrahlbeugung von graphitmonochromatisierter Mo-K $\alpha$ -Strahlung ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ , K $\alpha_1$  und K $\alpha_2$  nicht aufgelöst) bei variabler Scanbreite durchgeführt. Die Reflexe der an den Einkristallen gebeugten Röntgenstrahlen wurden mit IPDS2T-Einkristall-Diffraktometern der Firma STOE & Cie (Darmstadt, Deutschland) registriert. Die Kristalle wurden mit hochviskosem perfluoriertem Polyether benetzt und nach Untersuchung auf Eignung unter einem Mikroskop mit Polarisationsfilter mit Silikonfett auf einem Glasfaden platziert.

Nach der Messung und Datenreduktion erfolgte die Korrektur von LORENTZ- und Polarisierungseffekten. Die Verfeinerung erfolgte mittels Differenz-FOURIER-Analyse gegen  $F_0^2$  mit SHELXL-97 nach der *fullmatrix-least-squares*-Technik. Die Nicht-Wasserstoffatome wurden anisotrop verfeinert und die Positionen der Wasserstoffatome wurden in idealer Geometrie berechnet. Graphische Darstellungen erfolgten mit dem Programm DIAMOND 3.2. Die Messung und Datenanalyse erfolgten durch Frau Dr. B. CULA BRAUN und Frau D. PINKERT.

### 6-5-4 | Polarimetrie

Drehwerte ( $\alpha_D$ ) wurden an einem JASCO DIP-370 Polarimeter bei Standardbedingungen (589 nm, Analytkonzentration 10 g L<sup>-1</sup>) gemessen und auf  $c = 1$  (x100) korrigiert.

### 6-5-5 | Absorptionspektroskopie

Absorptionsspektren wurden mit einem Cary 100Bio UV/Vis (Varian, Palo Alto, US) in 3 mL fassenden 1x1 cm Quarzküvetten bei konstant 37°C aufgezeichnet. Dazu wurden 2 mM Stammlösungen der Proben in ASM-Puffer stufenweise verdünnt, die Extinktion aufgezeichnet und gegen das reine Lösungsmittel korrigiert. Die Schlitzbreite betrug 2.5 nm und die Scanrate 600 nm/min. Die Daten wurden geglättet (SAVITZKY-GOLAY 40-2) und die Maxima  $\lambda$  ermittelt. Die dekadischen molaren Extinktionskoeffizienten  $\varepsilon_{\lambda}$  wurden aus der Steigung der linearen Regressionsgeraden der Auftragung  $E_{\lambda}(c)$  ermittelt. Die Berechnungen und Darstellungen erfolgten unter Verwendung der OriginLab OriginPro 9.1G Software.

### 6-5-6 | Fluoreszenzspektroskopie

Fluoreszenzspektren wurden mit einem Cary Eclipse Spektrometer (Varian, Palo Alto, US) bei konstant 37°C in 3 mL fassenden 1x1 cm Quarzküvetten aufgezeichnet. Sofern nicht anderslautend angegeben betrugen die Schlitzbreiten 5 nm und die Scanrate 600 nm min<sup>-1</sup>. Die optische Dichte bei der verwendeten Wellenlänge betrug in jedem Experiment unter 0.05. Die erhaltenen Fluoreszenzdaten wurden korrigiert bezüglich Hintergrund und Volumen, optional geglättet (SAVITZKY-GOLAY 40-2), normalisiert und geplotted mittels OriginLab OriginPro 9.1G Software.

## 6-6 | Assay-Protokolle

### 6-6-1 | Homogener *in vitro* ASM-Assay

Die zeitliche Veränderung der Fluoreszenzintensität wurde bei konstant 37°C in magnetisch gerührten Küvetten verfolgt. Der Vollständigkeit halber wurden vor und nach Zugabe von **2** und optional während und nach der Reaktion komplette Spektren aufgezeichnet. Sofern nicht anderslautend beschrieben, betrugen alle Schlitzbreiten 5 nm und die PMT-Spannung 700 V. Fluoreszenzdaten wurden durch Nullspektrenabzug und Volumenkorrektur korrigiert, optional geglättet (SAVITZKY-GOLAY 40-2), normalisiert und geplotted mittels OriginLab OriginPro 9.1G Software. Verbleibender FRET wurde aus den erhaltenen zeitlichen Verläufen der NBD-Fluoreszenz errechnet indem vor der

Normalisierung auf den ersten Messpunkt die in einem Kontrollexperiment ermittelte Basisintensität bei vollständiger Sondenhydrolyse abgezogen wurde.

Ablauf: ASM- oder NSM-Puffer (meist 2970  $\mu\text{L}$ ) wird in Quarzküvetten (1 cm x 1 cm, 3 mL) gefüllt und Nullspektren aufgezeichnet (Ex/Em in nm: 347/(375-800), 355/(375-800), 474/(500-800), (300-375)/405, (300-500)/536). Sonde 2 (0.5 mM in DMSO, meist 6  $\mu\text{L}$  für 1  $\mu\text{M}$  final) wird zugegeben und statische Spektren aufgenommen (Werte wie für die Nullspektren). Anschließend wird rekombinante humane ASM aus Insektenzellen simultan zugegeben, die Küvetten verschlossen und im *multicell holder* platziert. Nach 30 s Vorinkubation werden Datenpunkte (347/405 + 347/536) oder vollständige Spektren (347/(375-800)) in Zeitintervallen aufgenommen (für 4 h alle 30 s und für weitere 14 h alle 30 min). Nach Beendigung der Reaktion wird die Reaktion durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  MeOH gestoppt. Optional können anschließend mittels FOLCH-Methode<sup>[3]</sup> die Lipide extrahiert und weiter analysiert werden. Für Sonde 1 wird ebenso verfahren, nur die Messfenster werden entsprechend angepasst (430/(470-800), (300-600)/624). Wenn Lysate verwendet werden, ist es von Vorteil Nullspektren und initiale Spektren mit 9/10 des Reaktionsvolumens (2700  $\mu\text{L}$ ) aufzunehmen, bevor zusätzlicher Puffer und Lysat (meist 35-100  $\mu\text{L}$  für etwa 100-300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  final) hinzugegeben werden.

### 6-6-2 | Lipidextraktion & -analyse

Küvette: Wässrige Reaktionslösung (3 mL) mit den zu isolierenden Lipiden wird durch Zugabe von 500  $\mu\text{L}$  MeOH gestoppt, verschlossen und 3-mal umgeschüttelt. Der Inhalt wird in ein neues Schnappdeckelgläschen gefüllt und die Küvetten mit insgesamt 2.5 mL MeOH und 6 mL Chloroform gespült und diese Spüllösung ebenfalls in das Gläschen gegeben (Endvolumen sollte 12 mL betragen). Die Gläschen werden verschlossen und das zweiphasige Gemisch kräftig geschüttelt. Nach vollständiger Phasentrennung (20 min) werden 250  $\mu\text{L}$  der dichteren (organischen) Phase separiert und vor Licht geschützt eingengt (speedVac oder Luftstrom). Die getrockneten Extrakte werden mittels HPLC-MS analysiert (isokratisch 85% B in A, Beispiele im Anhang) oder in 10  $\mu\text{L}$  MeOH aufgenommen, auf DC-Platten getupfelt und entwickelt ( $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O} = 100\text{:}15\text{:}1$ ).

$R_f$ , Sonde 2 ( $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O} = 100\text{:}15\text{:}1$ ) = 0.08;

$R_f$ , MCC-Ceramid 5 ( $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O} = 100\text{:}15\text{:}1$ ) = 0.68;

$R_f$ , unbekannt ( $\text{CHCl}_3\text{:MeOH:H}_2\text{O} = 100\text{:}15\text{:}1$ ) = 0.60;



Kulturschale: WT, OE oder KO-MEFs wurden unter Standardbedingungen kultiviert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). Verbrauchtes Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit sterilem PBS-Puffer gewaschen. 1 µM BSA-komplexierte Sonde **2** in OptiMEM (2% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) wurde zugegeben. Anschließend erfolgte Inkubation unter Standardbedingungen und Ausschluss von Licht über die angegebenen Zeitintervalle (1 h, 6 h, 24 h, 48 h). Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS-Puffer gewaschen. Mit einer Pipettenspitze wurden die Zellen abgeschabt und mit 500 µL MeOH in ein silikonisiertes Mikroreaktionsgefäß überführt. Der Vorgang wurde wiederholt. Die vereinigten methanolischen Lysate wurden für 5 min mit Ultraschall behandelt. MeOH wurde unter vermindertem Druck entfernt (SpeedVac). Der Rückstand wurde mit 900 µL CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 2:1 versetzt und gut durchmischt. Nach Zentrifugation (13400 rpm, 5 min) wurde die wässrige Phase entfernt. Die verbliebene organische Phase wurde mit 300 µL H<sub>2</sub>O versetzt, erneut durchmischt und zentrifugiert. 250 µL der organischen Phase wurden zur Trockne eingeeengt (SpeedVac) und in 100 µL MeOH:H<sub>2</sub>O = 85:15 mit 0.1% TX-100 aufgenommen. Anschließend wurden Aliquote von 5 µL mittels HPLC-FLD analysiert. Die Arbeiten erfolgten durch Frau L. MARONGIU und Frau S. DIEDERICH.

### 6-6-3 | Lipidanalyse mittels HPLC-FLD

Verdünnte Lipidextrakte wurden mittels HPLC-FLD (siehe Abschnitt 6-4-4), unter isokratischen Bedingungen (85% B in A, Solvent A = (99.9% H<sub>2</sub>O + 0.1% FA), Solvent B = (99.9% MeOH + 0.1% FA)) mit einer Flussrate von 0.4 mL min<sup>-1</sup> bei 40°C analysiert. Die Fluoreszenzdetektion erfolgte bei 405 und 536 nm nach Anregung bei 355 nm. Synthetisches MCC-Cumarin **5** (2.4 min) und Sonde **2** (5.3 min) dienten als Referenz. Die nach Integration der Flächen unter den Signalen erhaltenen Werte sind proportional zur Menge der im Lipidextrakt enthaltenen markierten Lipide.

## 6-7 | Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikroskopie erfolgte bei Standardkulturbedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) an einem Olympus FV-1000 MPE Mikroskop, das mit einer Tokai *hit stage top* Inkubationskammer für CO<sub>2</sub>, Temperatur und Luftfeuchtigkeit ausgerüstet wurde. Als Objektiv diente ein 60x UPLAN SApo (NA 1.2) Wasserobjektiv. Das Olympus FV-1000 MPE-Mikroskop basiert auf dem Olympus IX-81 Fluoreszenzmikroskop (invertiert, komplett motorisiert) und erlaubt die Bildgebung unter Nutzung des Durchlichts mit DIC oder Phasenkontrast (100x) oder Beleuchtung mittels Halogen, HBO, Diodenlaser (405 nm, 440 nm), Argonlaser ((458 nm), 488 nm, 515 nm), Diodenlaser (561 nm, 635 nm) oder Multiphotonenanregung mittels Spectra-Physics Mai Tai DeepSee (710-990 nm). Einphotonenanregung der Probe erfolgte entweder durch die 488 nm Laserlinie eines Argon-Lasers (NBD) oder mittels eines 635 nm Diodenlasers (Lysotracker DeepRed). Zur Zweiphotonenanregung wurde 730 nm (0.05-0.5 W) Laserlicht (MCC) eingestrahlt. Multiphotonendetektion erfolgte durch zwei parallele, *non-descanned* Detektoren des Olympus V/G Filterwürfels (420-460 nm/495-540 nm). Sofern nicht anderslautend angegeben, betrug die Scanrate 8 µs Pixel<sup>-1</sup>, und die Bildgröße 1024x1024 oder 512x512 Pixel.

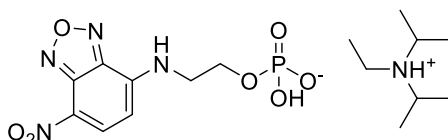
WT- oder ASM-KO-MEF-Zellen wurden in 35 mm MatTek Glasbodenschalen oder ibidi µ-slides<sup>VI</sup> in Kulturmedium (siehe oben, mit Phenolrot) bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Vor jedem Mikroskopieexperiment wurden die Zellen gewaschen und mit Imaging-Medium (ohne Phenolrot) überschichtet, in dem die Fluoreszenz-Sonde (1-10 µM final, entweder als Stammlösung in DMSO oder 1:1-BSA-Komplex zugegeben) enthalten war. Im Allgemeinen waren die Zellen nach 2 Tagen Inkubation 80-90% konfluent. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten mikroskopiert und ggf. zur Kolo-kalisation 45 min zuvor mit 50 nM Lysotracker DeepRed versetzt. Zur Hintergrund-Korrektur der Zweiphotonenfluoreszenzbilder diente eine Region ohne Zellen. Die effektive FRET-Effizienz nach *acceptor bleaching* wurde unter Nutzung der Olympus Fluoview Software nach der folgenden Gleichung berechnet.

$$E = 1 - \frac{1 + \text{MCC}_{\text{prebleach}}}{1 + \text{MCC}_{\text{postbleach}}}$$

## 6-8 | Synthese

### 6-8-1 | Aminoethanol-Derivate

#### *N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylammonium-2-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino)-ethylphosphat 3



2-Aminoethylphosphorsäure (0.010 g, 0.074 mmol, 1.0 eq.) wurde in MeOH (1.5 mL) vorgelegt und DIPEA (80  $\mu$ L, 0.486 mmol, 6.6 eq.) zugegeben. NBDCl (0.015 g, 0.074 mmol, 1.0 eq.) wurde zugegeben und vor Licht geschützt 24 h bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde im Luftstrom eingengt. Mittels Säulenchromatographie (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH = 3:2:0  $\rightarrow$  9:40:1) erhaltene produktthaltige Fraktionen wurden vereinigt und durch erneute Säulenchromatographie (Polygoprep 60-50 C18, H<sub>2</sub>O:MeCN = 1:0  $\rightarrow$  95:5) aufgereinigt. Die Titelverbindung wurde als orangefarbener Feststoff (0.006 mg, 0.015 mmol, 20%) isoliert.

$R_f$ (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH = 9:40:1) = 0.28;

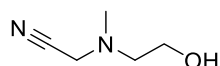
$R_f$ (MeCN:H<sub>2</sub>O = 6:4) = 0.76;

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 8.41 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 6.51 – 6.25 (m, 1H, CH<sub>ar</sub>), 4.16 (dd,  $J$  = 12.0, 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.80 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.75 – 3.64 (m, 2H, DIPEA), 3.18 (q,  $J$  = 7.4 Hz, 2H, DIPEA), 1.32 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 15H, DIPEA);

<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-NMR (202 MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  = 1.21(s, 1P);

HRMS (ESI): C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>7</sub>P [M-H]<sup>-</sup>:

$m/z$  ber.: 303.0136, gef.: 303.0129.

**2-((2-Hydroxyethyl)(methyl)amino)acetonitril 10**

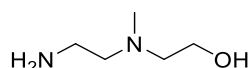
In einer verschlossenen Apparatur mit Innenthermometer, Druckausgleich und Rückflusskühler wurde 37% (*m/m*) Formalinlösung (4.050 g, 50.00 mmol, 1 eq.) vorgelegt. Unter Wasserkühlung wurde erst eine Lösung von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  (5.230 g, 27.50 mmol, 0.55 eq.) in dest. Wasser (9 mL) und dann 2-(*N*-Methylamino)ethanol (4.04 mL, 50.00 mmol, 1 eq.) so zugetropft, dass die Temperatur der Lösung 30°C nicht überstieg. Nach Sicherstellung eines basischen pH der Lösung wurde KCN (3.260 g, 50.00 mmol, 1 eq.) in dest.  $\text{H}_2\text{O}$  (4 mL) gelöst und über 15 min zugetropft. Es wurde 3 h bei 50°C und über Nacht bei RT gerührt. Es bildete sich ein weißer Feststoff, der abgesaugt und mit  $\text{CHCl}_3$  gewaschen wurde. Das vereinigte Filtrat wurde dreimal mit  $\text{CHCl}_3$  (je 10 mL) extrahiert, die vereinigten organischen Extrakte über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet, filtriert und im Grobvakuum vom Lösungsmittel befreit. Es wurde ein klares Öl (5.64 g, 49.40 mmol, 99%.) erhalten.<sup>[183]</sup>

$R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 1:1) = 0.84;$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 3.67 - 3.62$  (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 3.59 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 2.68 – 2.62 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.40 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 114.6$  (CN), 58.7 ( $\text{CH}_2$ ), 57.3 ( $\text{CH}_2$ ), 45.4 ( $\text{CH}_2$ ), 41.6 ( $\text{CH}_3$ );

HRMS (ESI): $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{ON}_2$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ :	$m/z$ ber.: 115.0866, gef.: 115.0866,
$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{ON}_2\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	$m/z$ ber.: 137.0685, gef.: 137.0684,
$\text{C}_5\text{H}_{10}\text{ON}_2\text{K}$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ :	$m/z$ ber.: 153.0420, gef.: 153.0423.

**2-[(2-Aminoethyl)(methyl)amino]ethanol 11**

Unter Schutzgasatmosphäre wurde pelletiertes  $\text{LiAlH}_4$  (11.800 g, 285.00 mmol, 2.85 eq.) vorsichtig unter Eiskühlung in tr. THF (240 mL) suspendiert. Anschließend wurde **10** (11.400 g, 100.00 mmol, 1.00 eq.) tropfenweise bei derselben Temperatur zugegeben.

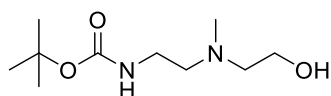
Nach Beendigung der Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für 90 min unter kräftigem Rühren zum Sieden erhitzt und anschließend bei RT über Nacht weiter gerührt. Unter Eiskühlung wurde die Reaktion durch tropfenweise Zugabe von dest. H<sub>2</sub>O (10.8 mL), 15% (*m/m*) NaOH (10.8 mL) und nochmals dest. H<sub>2</sub>O (32.4 mL) beendet (Löschung nach FIESER). Die graue Suspension wurde mit THF (120 mL) verdünnt, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und mit Celite aufgeschlämmt. Die Aufschlammung wurde über eine Nutsche vakuumfiltriert und der Filtrerrückstand mit reichlich THF erneut aufgeschlämmt und wiederholt abgesaugt. Die vereinigten organischen Filtrate wurden im Grobvakuum eingeeengt. Das erhaltene Rohprodukt (11.7 g) wurde anschließend mittels Kugelrohrdestillation bei 120°C destilliert. Bei einem Druck von 2 mbar wurde die Titelverbindung als farbloses Öl (10.300 g, 87.16 mmol, 87%) erhalten.<sup>[184]</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 3.64 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.73 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.54 (t, *J* = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.49 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.28 (s, 3H, CH<sub>3</sub>);

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 61.00 (CH<sub>2</sub>), 60.7 (CH<sub>2</sub>), 60.3 (CH<sub>2</sub>), 42.9 (CH<sub>3</sub>), 39.7 (CH<sub>2</sub>);

HRMS (ESI): C<sub>5</sub>H<sub>15</sub>ON<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: *m/z* ber.: 119.1179, gef.: 119.1179,  
C<sub>5</sub>H<sub>14</sub>ON<sub>2</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>: *m/z* ber.: 141.0998, gef.: 141.0998.

## 2-[(2-Hydroxyethyl)(methyl)amino]ethylcarbaminsäure-*tert*-butylester 12



In THF (43 mL) wurden **11** (0.500 g, 4.231 mmol, 1 eq.) und Di-*tert*-butyldicarbonat (0.923 g, 4.231 mmol, 1 eq.) gelöst und bei 800 mbar und 40°C für 2 h am Rotationsverdampfer zur Reaktion gebracht. Anschließend wurde im Grobvakuum eingeeengt. Kurze Säulenchromatographie (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 95:5 → 92:8) lieferte die Titelverbindung als farbloses Öl (0.345 g, 1.580 mmol, 37%).

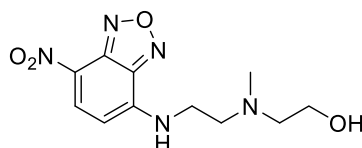
*R<sub>f</sub>*(CHCl<sub>3</sub>:MeOH:NEt<sub>3</sub> = 89:10:1) = 0.18;

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 4.96 (s, 1H, NH), 3.63 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.26 (dd, *J* = 11.3, 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.95 (bs, 1H, OH), 2.64 – 2.53 (m, 4H, 2x CH<sub>2</sub>), 2.32 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 1.43 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>);

$^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 156.1 (COO), 79.4 ( $\text{CMe}_3$ ), 59.1 ( $\text{CH}_2$ ), 58.4 ( $\text{CH}_2$ ), 57.1 ( $\text{CH}_2$ ), 41.6 ( $\text{NCH}_3$ ), 37.9 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 28.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ).

MS (ESI): n.b. (Zersetzung)

#### 4-{2-[(2-Hydroxyethyl)(methyl)amino]ethylamino}-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 13



NBDCl (0.150 g, 1.269 mmol, 1 eq.) wurde in MeOH (30 mL) gelöst. Bei RT wurde NaOAc (0.104 g, 1.269 mmol, 1 eq.) zugegeben. **11** (0.48 g, 4.060 mmol, 1 eq.) wurde in MeOH (20 mL) gelöst und zugetropft. Die Lösung färbte sich rasch braun und wurde vor Licht geschützt für 2.5 h bei RT gerührt. Das Gemisch wurde anschließend zur Trockne eingeeengt in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  aufgenommen, auf Celite adsorbiert und getrocknet. Mittels Säulenchromatographie ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH = 1:0  $\rightarrow$  9:1) wurde die Titelverbindung als gelb-brauner Feststoff (0.116 g, 0.414 mmol, 33%) isoliert. Die Verbindung kristallisiert in Form feiner Nadeln aus konzentrierter, mit  $\text{CHCl}_3$  unterschichteter, methanolischer Lösung (Kristallographische Daten & Messparameter siehe Anhang, Abschnitt 9-5).

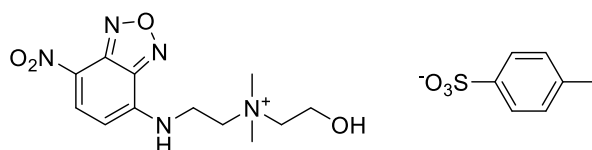
$R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH} = 9:1) = 0.36$ ;

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 8.51 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar,NBD}}$ ), 6.38 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar,NBD}}$ ), 4.59 (s, 1H, NH), 3.70 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 4H, 2x  $\text{CH}_2$ ), 2.88 (t,  $J$  = 6.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.68 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.42 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ );

$^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 145.9 ( $\text{C}_{\text{ar,NBD}}$ ), 145.5 ( $\text{C}_{\text{ar,NBD}}$ ), 138.4 ( $\text{CH}_{\text{ar,NBD}}$ ), 138.1 ( $\text{C}_{\text{ar,NBD}}$ ), 132.4 ( $\text{CH}_{\text{ar,NBD}}$ ), 116.2 ( $\text{C}_{\text{ar,NBD}}$ ), 62.8 ( $\text{CH}_2$ ), 60.2 ( $\text{CH}_2$ ), 60.1 ( $\text{CH}_2$ ), 56.3 ( $\text{CH}_2$ ), 42.6 ( $\text{NCH}_3$ );

HRMS (ESI):	$\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_4\text{N}_5$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ :	$m/z$ ber.: 282.1197, gef.: 282.1194,
	$\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}_5\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	$m/z$ ber.: 304.1016, gef.: 304.1017.

***N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-[2-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino)ethyl]-*N,N*-dimethylammonium-*para*-toluensulfonat 14**



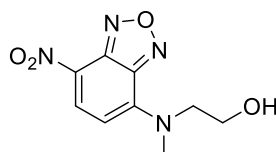
**13** (0.390 g, 1.387 mmol, 1 eq.) wurde in MeCN (50 mL) gelöst. Bei RT wurde *para*-Toluensulfonsäuremethylester<sup>[185]</sup> (0.284 g, 1.525 mmol, 1.1 eq.) in MeCN (20 mL) gelöst und zugetropft. Die Lösung wurde vor Licht geschützt für 4 h unter Rückfluss erhitzt und weitere 15 h bei RT gerührt. Beim Abkühlen fiel ein feiner gelber Feststoff aus, der abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet wurde. Die Titelverbindung wurde in Form goldgelber Plättchen erhalten (0.646 g, 1.380 mmol, 99%).

$R_f(\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:4 \text{ M NH}_4\text{OH} = 7:9:3) = 0.25;$

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 8.33$  (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar,NBD}}$ ), 7.52 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{ar,Tos}}$ ), 7.19 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_{\text{ar,Tos}}$ ), 6.27 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar,NBD}}$ ), 4.03 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.01 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.75 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.57 (dd,  $J = 5.8, 3.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.22 (s, 6H,  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ), 2.24 (s, 3H,  $\text{C}_{\text{ar}}\text{CH}_3$ );

MS (ESI):  $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{O}_4\text{N}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z$  ber.: 296.1353, gef.: 296.2.

**2-[Methyl-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]ethanol 15**



Zu einer Suspension von NBDCl (0.400 g, 2.000 mmol, 1 eq.) in EtOH (10 mL) wurde bei RT eine Lösung von 2-*N*-Methylaminoethanol (0.48 mL, 6.00 mmol, 3 eq.) in EtOH (20 mL) getropft. Die Lösung wurde nach beendeter Zugabe für 2 h unter Rückfluss erhitzt. Beim Erkalten schieden sich Kristalle ab. Diese wurden abgesaugt, mit kaltem EtOH gewaschen und aus EtOH rekristallisiert. Nach Trocknung wurde die Titelverbindung in Form orange-farbener Nadeln erhalten (0.426 g, 1.788 mmol, 89%).

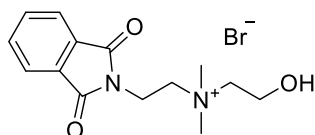
$R_f(\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 100:15:1) = 0.56;$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, DMSO,  $T = 60^\circ\text{C}$ ,  $D_1 = 10$  s)  $\delta = 8.44$  (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar,NBD}}$ ), 6.43 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar,NBD}}$ ), 4.82 (t,  $J = 5.5$  Hz, 1H, OH), 4.17 (t,  $J = 5.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.78 (q,  $J = 5.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.55 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, DMSO,  $T = 60^\circ\text{C}$ ,  $D_1 = 10$  s)  $\delta = 146.2$  ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 144.6 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 144.4 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 135.8 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 120.0 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 102.2 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 58.4 ( $\text{CH}_2$ ), 57.1 ( $\text{CH}_2$ ), 42.1 ( $\text{CH}_3$ );

HRMS (ESI):  $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_4\text{N}_4$   $[\text{M-H}]^-$ :  $m/z$  ber.: 237.0629, gef.: 237.0628,  
 $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_4\text{N}_5\text{Cl}$   $[\text{M+Cl}]^-$ :  $m/z$  ber.: 237.0396, gef.: 237.0394.

***N*-[2-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)ethyl]-*N*-(2-hydroxyethyl)-*N,N*-dimethylammoniumbromid 16**



Zu einer Lösung von 2-Phthalimidoethylbromid (1.371 g, 5.396 mmol, 1 eq.) in MeCN (5 mL) wurde bei RT tropfenweise 2-*N,N*-Dimethylaminoethanol (1.08 mL, 10.792 mmol, 2 eq.) in MeCN (5 mL) zugegeben. Die zunächst klare Lösung wurde für 24 h unter Rückfluss erhitzt, wobei ein weißer Feststoff ausfiel. Nach Erkalten der Lösung wurde der Feststoff abgesaugt, mit wenig eiskaltem MeCN gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Die Titelverbindung wurde als farbloses feinkristallines Pulver (1.550 g, 4.515 mmol, 84%) erhalten.

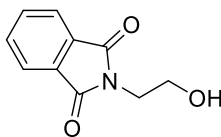
$R_f(\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 65:25:3) = 0.00;$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 7.91 - 7.81$  (m, 4H, 2x  $\text{CH}_2$ ), 4.21 – 4.14 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.11 – 4.05 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.76 – 3.71 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.65 – 3.59 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.28 (s, 6H, 2x $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta = 169.61$  (CO), 134.99 (CH), 131.11 (C), 123.64 (CH), 65.59 ( $\text{CH}_2$ ), 61.21 ( $\text{CH}_2$ ), 55.30 ( $\text{CH}_2$ ), 51.86 ( $\text{CH}_3$ ), 31.44 ( $\text{CH}_2$ );

HRMS (ESI):  $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{N}_2$   $[\text{M-Br}]^+$ :  $m/z$  ber.: 263.1390, gef.: 263.1390.



**2-(2-Hydroxyethyl)isoindolin-1,3-dion 17**

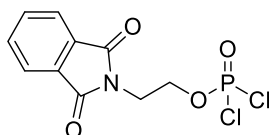
Phthalsäureanhydrid (4.220 g, 28.000 mmol, 1 eq.) wurde in DMF (30 mL) gelöst und 2-Aminoethanol (1.70 mL, 28.000 mmol, 1 eq.) bei RT zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für 24 h unter Rückfluss erhitzt, auf RT abgekühlt und in EA (200 mL) und 0.1 M aq. HCl (100 mL) aufgenommen. Die organische Phase wurde abgetrennt und mit ges. aq. NaCl (200 mL) gewaschen, getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ) und zur Trockne eingengt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde aus siedendem Toluol kristallisiert und ergab die Titelverbindung in Form farbloser Kristalle (4.220 g, 22.100 mmol, 79%).

$R_f(\text{EA:CH} = 1:1) = 0.36$ ;

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.94 – 7.65 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 4.05 – 3.76 (m, 4H, 2x  $\text{CH}_2$ ), 2.23 (s, 1H, OH);

$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 168.8 (CO), 134.1 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 131.9 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 123.4 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 61.1 ( $\text{CH}_2$ ), 40.8 ( $\text{CH}_2$ );

HRMS (ESI): $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_3\text{N}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ :	$m/z$ ber.: 192.0655, gef.: 192.0653,
$\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_3\text{NNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	$m/z$ ber.: 214.0475, gef.: 214.0472.

**O-2-Phthalimidoethylphosphorodichloridat 18**

Unter Ar-Atmosphäre wurde gut getrocknetes **17** (0.600 g, 3.138 mmol, 1 eq.) in tr. Benzen (5 mL) gelöst.  $\text{POCl}_3$  (0.8 mL, 8.765 mmol, 2.8 eq.) wurde tropfenweise addiert und die Reaktionsmischung wurde 4 h unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurden bei 60°C flüchtige Bestandteile abdestilliert und der ölige Rückstand in tr. Diethylether (5 mL) aufgenommen. Unter Feuchtigkeitsausschluss erfolgte Kristallisation bei -20°C. Mittels

Filterkanüle wurde der Feststoff separiert. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde die Titelverbindung als elfenbeinfarbener Feststoff (0.690 g, 2.240 mmol, 71%) isoliert.

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.82 (ddd,  $J$  = 38.8, 5.5, 3.1 Hz, 4H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 4.57 (dt,  $J^{\text{PH}}$  = 10.7 Hz,  $J^{\text{HH}}$  = 5.4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 4.10 (td,  $J^{\text{HH}}$  = 5.4 Hz,  $J^{\text{PH}}$  = 1.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ );

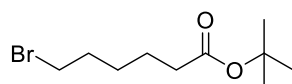
$^{13}\text{C-NMR}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 167.7 ( $\text{C}_{\text{ar}}=\text{O}$ ), 134.3 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 131.7 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 123.6 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 67.7 (d,  $J^{\text{PC}}$  = 8.9 Hz,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 37.3 (d,  $J^{\text{PC}}$  = 9.4 Hz,  $\text{CH}_2\text{N}$ );

$^{31}\text{P-NMR}$  (121 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.97 (t,  $J^{\text{HP}}$  = 10.4 Hz, 1P);

HRMS (ESI): n.b. (Zersetzung).

## 6-8-2 | Fettsäure-Derivate

### 6-Bromhexansäure-*tert*-butylester 23



Unter Ar-Atmosphäre wurde 6-Bromhexansäure (5.670 g, 29.00 mmol, 1 eq.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (116.0 mL) gelöst und *tert*-Butanol (13.7 mL, 146.00 mmol, 5 eq.), sowie DMAP (0.350 g, 2.90 mmol, 0.1 eq.) zugegeben. Bei 0°C wurde *N,N'*-Dicyclohexylcarbodiimid (7.780 g, 38.00 mmol, 1.3 eq.) addiert und weiter bei RT gerührt. Nach 65 h wurde die Suspension über Celite filtriert, und der Filtrerrückstand mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  gewaschen und die vereinigten organischen Phasen mit 2x 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 2x 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  und ges. aq. NaCl (je 50 mL) gewaschen. Anschließend wurde getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), gefiltert und zur Trockne eingengt. Der Rückstand wurde mittels Säulenchromatographie (EA:CH = 1:99 → 5:95) aufgereinigt. Nach Trocknung wurde die Titelverbindung als niedrig viskose farblose Flüssigkeit (4.650 g, 18.51 mmol, 64%) erhalten.

$R_f(\text{EA:CH}=5:95) = 0.28$ ;

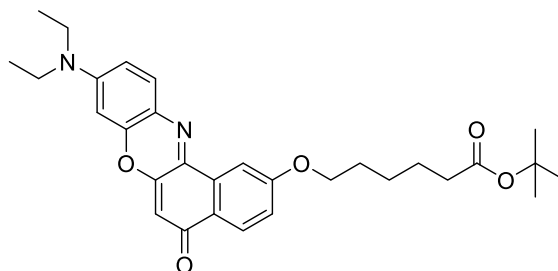
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 3.40 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.22 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.91 – 1.82 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.60 (dt,  $J$  = 15.1, 7.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.46 (dt,  $J$  = 5.7, 4.0 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.43 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ );

$^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 172.8 (COO), 80.1 ( $\text{CMe}_3$ ), 35.3 ( $\text{CH}_2$ ), 33.5 ( $\text{CH}_2$ ), 32.4 ( $\text{CH}_2$ ), 28.1 ( $(\text{CH}_3)_3$ ), 27.6 ( $\text{CH}_2$ ), 24.2 ( $\text{CH}_2$ );

HRMS (ESI):  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{Br}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

$m/z$  ber.: 273.0461, gef.: 273.0464.

**6-(9-Diethylamino-5-oxo-5H-benzo[*a*]phenoxazin-2-yloxy)hexansäure-*tert*-butylester 24**



Unter Ar-Atmosphäre wurden **20** (0.115 g, 0.344 mmol, 1 eq., dargestellt nach [117]) und **23** (0.095 g, 0.3779 mmol, 1.1 eq.) in DMF (6.0 mL) gelöst und  $\text{K}_2\text{CO}_3$  (0.114 g, 0.8244 mmol, 2.4 eq.) zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde vor Licht geschützt für 20 h unter Rückfluss erhitzt. Zu diesem Zeitpunkte zeigte DC (EA:CH = 1:1) vollständigen Umsatz an. Die Reaktionsmischung wurde mit EA (30 mL) verdünnt und mit  $\text{H}_2\text{O}$  (30 mL) gewaschen. Die Phasen wurden getrennt und die wässrige Phase wurde mit EA rückextrahiert, bis die organische Phase farblos blieb. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) und zur Trockne eingeengt. Säulenchromatographie (EA:CH = 1:2) lieferte die Titelverbindung als dunkelviolettes Öl (0.094 g, 0.1871 mmol, 54%), welches sich nach längerem Stehen verfestigte.

$R_f(\text{EA:CH}=1:2) = 0.38$ ;

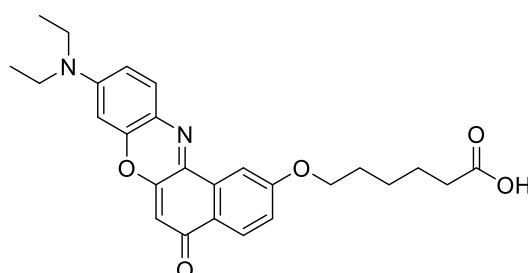
$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8.17 (dd,  $J$  = 8.7, 1.1 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.99 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.54 (dd,  $J$  = 9.0, 1.9 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.13 (ddd,  $J$  = 8.8, 1.9, 1.5 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.60 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.40 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.25 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 4.15 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.42 (q,  $J$  = 6.6 Hz, 4H, 2x  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 2.27 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.94 – 1.79 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.69 (dt,  $J$  = 15.1, 7.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.58 – 1.51 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.44 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 1.24 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H, 2x  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 183.2 ( $\text{C}_{\text{arO}}$ ), 173.0 ( $\text{COO}$ ), 161.7 ( $\text{C}_{\text{arOCH}_2}$ ), 152.0 ( $\text{C}_{\text{arNEt}_2}$ ), 150.6 ( $\text{C}_{\text{arOC}_{\text{ar}}}$ ), 146.7 ( $\text{C}_{\text{arOC}_{\text{ar}}}$ ), 139.9 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 134.0 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 131.0 ( $\text{C}_{\text{arH}}$ ), 127.6 ( $\text{C}_{\text{arH}}$ ), 125.5 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 124.6 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 118.2 ( $\text{C}_{\text{arH}}$ ), 109.4 ( $\text{C}_{\text{arH}}$ ), 106.4 ( $\text{C}_{\text{arH}}$ ), 105.2 ( $\text{C}_{\text{arH}}$ ), 96.2 ( $\text{C}_{\text{arH}}$ ), 80.1 ( $\text{CMe}_3$ ), 68.0 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 45.0 (2x  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 35.4 ( $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 28.9 ( $\text{CH}_2$ ), 28.1 ( $(\text{CH}_3)_3$ ), 25.6 ( $\text{CH}_2$ ), 24.8 ( $\text{CH}_2$ ), 12.6 (2x  $\text{CH}_3$ );

HRMS(ESI):  $\text{C}_{30}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

$m/z$  ber.: 505.2697, gef.: 505.2693.

## 6-(9-Diethylamino-5-oxo-5H-benzo[*a*]phenoxazin-2-yloxy)hexansäure 22



Bei 0°C wurde TFA (0.33 mL, 4.280 mmol, 90 eq.) tropfenweise zu einer Lösung von **24** (0.024 g, 0.048 mmol, 1 eq.) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL) gegeben. Die tiefblaue Reaktionsmischung wurde vor Licht geschützt und für 1 h bei 0°C und für weitere 4 h bei RT gerührt. Zu diesem Zeitpunkte zeigte DC (EA:CH = 1:1) vollständigen Umsatz des Edukts an. Die Reaktionsmischung wurde auf 0°C gekühlt und mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) verdünnt. Nach Zugabe von ges. aq.  $\text{NaHCO}_3$  (20 mL) wurde die wässrige Phase mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  20:1 (2x 42 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), gefiltert und zur Trockne eingedunstet. Säulenchromatographie ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :EA:MeOH:AcOH = 30:20:0:0  $\rightarrow$  30:15:4:1) lieferte die Titelverbindung als dunkelvioletten Feststoff (0.020 g, 0.044 mmol, 92%).

$R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EA}:\text{MeOH}:\text{AcOH} = 30:15:4:1) = 0.58$ ;

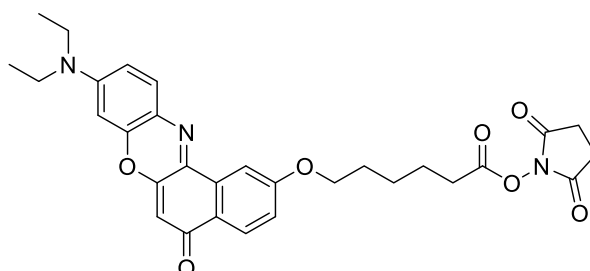
$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 8.10 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.96 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.54 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.09 (dd,  $J$  = 8.7, 2.5 Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.61 (dd,  $J$  = 9.1, 2.7 Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.39 (d,  $J$  = 2.7 Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.22 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 4.10 (t,  $J$  = 6.3 Hz, 2H,  $\text{OCH}_2$ ), 3.40 (q,  $J$  = 7.1 Hz, 4H,  $\text{N}(\text{CH}_2\text{Me})_2$ ), 2.31 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 1.89 – 1.75 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.75 – 1.60 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.60 – 1.48 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.20 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H, 2x  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 183.7 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{O}$ ), 169.3 ( $\text{COO}$ ), 161.8 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 152.3 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 150.9 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 146.8 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 139.2 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 134.0 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 131.0 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ ), 127.5 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ ), 125.1 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 124.7 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 118.2 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ ), 109.8 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ ), 106.4 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ ), 104.6 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ ), 96.0 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ ), 68.0 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ), 45.0 (2x  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 28.8 ( $\text{CH}_2$ ), 25.6 ( $\text{CH}_2$ ), 24.7 ( $\text{CH}_2$ ), 12.4 (2x  $\text{CH}_3$ );

HRMS(ESI):  $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{N}_2\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

$m/z$  ber.: 449.2071, gef.: 449.2070.

### 6-(9-Diethylamino-5-oxo-5H-benzo[a]phenoxazin-2-yloxy)hexansäure-N-succinimidylester **26**



Unter Ar-Atmosphäre wurden **22** (0.180 g, 0.401 mmol, 1 eq.), HOSu (0.055 g, 0.482 mmol, 1.2 eq.) und DMAP (0.059 g, 0.482 mmol, 1.2 eq.) in  $\text{CHCl}_3$  (2 mL, frei von hydroxyliischen Stabilisatoren!) gelöst und vor Licht geschützt. EDC (0.154 g, 0.803 mmol, 2 eq.) wurde in  $\text{CHCl}_3$  (2 mL) gelöst und tropfenweise bei  $0^\circ\text{C}$  zugegeben. Nach 5 min wurde das Eisbad entfernt und für weitere 4 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde beendet und die Reaktionsmischung wurde mit 0.5 M aq.  $\text{KHSO}_4$  (2x 20 mL) sowie mit  $\text{H}_2\text{O}$  (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet ( $\text{MgSO}_4$ ), filtriert und zur Trockne eingengt. Auf diese Weise wurde tiefroter Roh-Aktivester (230 mg, Reinheit lt. DC etwa 80%) gewonnen, welcher sofort weiterverwendet wurde.

$R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{EA}=5:1) = 0.24$ ;

HPLC-MS (ESI, Gradient A):  $R_t = 2.45$  min

$\text{C}_{30}\text{H}_{32}\text{N}_3\text{O}_7$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :

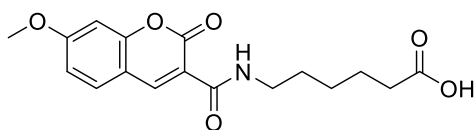
$m/z$  ber.: 546.2235, gef.: 546.2,

$\text{C}_{30}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_7\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :

$m/z$  ber.: 568.2054, gef.: 568.2,

$\text{C}_{60}\text{H}_{62}\text{N}_6\text{O}_{14}\text{Na}$   $[2\text{M}+\text{Na}]^+$ :

$m/z$  ber.: 1113.4216, gef.: 1113.3.

**6-(7-Methoxy-2-oxo-2H-chromen-3-carboxamido)hexansäure 25**

Unter Ar-Atmosphäre wurde 6-Aminohexansäure (0.025 g, 0.189 mmol, 1 eq.) in tr. DMF (1.9 mL) gelöst und tr. DIPEA (39  $\mu$ L, 0.227 mmol, 1.2 eq.) zugegeben. Bei 0°C wurde kommerzieller 7-Methoxycumarin-3-carbonsäure-*N*-succinimidylester (MCC-OSu) unter Lichtausschluss zugegeben, für 2 h bei derselben Temperatur und für weitere 22 h unter langsamer Erwärmung auf RT gerührt. Zu diesem Zeitpunkte zeigten DC und HPLC-MS vollständigen Eduktumsatz an. Die Reaktionsmischung wurde mit 20 mL EA verdünnt und mit 10%iger (*m/m*) Zitronensäure (3x 10 mL) und ges. aq. NaCl (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert und zur Trockne eingeeengt. Säulenchromatographie (EA:AcOH = 99:1) und präparative DC ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ :MeOH = 9:1) lieferten die Titelverbindung als farblosen Feststoff (0.057 g, 0.172 mmol, 91%).

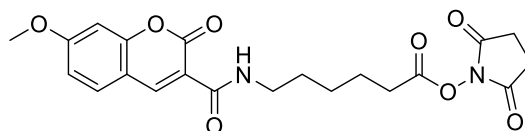
$R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}=9:1) = 0.44$ ;

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8.85 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 8.81 (t,  $J$  = 4.9 Hz, 1H, NH), 7.58 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.93 (dd,  $J$  = 8.7, 2.3 Hz, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.86 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 3.91 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.45 (dd,  $J$  = 13.3, 6.7 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 2.37 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.76 – 1.59 (m, 4H, 2x  $\text{CH}_2$ ), 1.50 – 1.40 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 178.4 (COO), 164.8 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{OMe}$ ), 162.1 (CO), 161.9 (CO), 156.6 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 148.4 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 131.0 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ ), 114.7 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 114.0 ( $\text{C}_{\text{ar}}\text{H}$ ), 112.4 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 100.3 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 56.0 ( $\text{OCH}_3$ ), 39.5 ( $\text{CH}_2\text{NH}$ ), 33.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.1 ( $\text{CH}_2$ ), 26.4 ( $\text{CH}_2$ ), 24.3 ( $\text{CH}_2$ );

HPLC-MS (ESI):  $R_t=1.93$  min

$\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{NO}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ :	$m/z$ ber.: 334.1285, gef.: 334.1,
$\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_6\text{Na}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	$m/z$ ber.: 356.1105, gef.: 356.1,
$\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{NO}_6$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ :	$m/z$ ber.: 332.1140, gef.: 332.1.

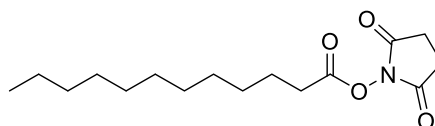
**6-(7-Methoxy-2-oxo-2H-chromen-3-carboxamido)hexansäure-N-succinimidylester 27**

Unter Ar-Atmosphäre wurde **25** (0.040 g, 0.117 mmol, 1 eq.) in tr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5.9 mL) gelöst und DMAP (0.017 g, 0.140 mmol, 1.2 eq.), sowie HOSu (0.016 g, 0.140 mmol, 1.2 eq.) zugegeben. Bei 0°C wurde EDC (0.045 g, 0.234 mmol, 2 eq.) addiert und weitere 22 h unter Lichtausschluss und langsamer Erwärmung auf RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (20 mL) verdünnt und mit 0.5 M KHSO<sub>4</sub> (2x 40 mL) sowie ges. aq. NaCl (10 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), gefiltert und zur Trockne eingedunstet. Der so erhaltene farblose Roh-Aktivester wurde unter Annahme quantitativen Umsatzes direkt weiterverwendet.

$R_f(\text{EA:MeOH:AcOH}=94:5:1) = 0.67;$

HPLC-MS (ESI, Gradient A):  $R_t=1.99$  min

$\text{C}_{21}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_8$ [M+H] <sup>+</sup> :	$m/z$ ber.: 431.1449, gef.: 431.1,
$\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_8\text{Na}$ [M+Na] <sup>+</sup> :	$m/z$ ber.: 453.1268, gef.: 453.1,
$\text{C}_{42}\text{H}_{44}\text{N}_4\text{O}_{16}$ [2M+Na] <sup>+</sup> :	$m/z$ ber.: 883.2645, gef.: 883.1.

**Laurinsäure-N-succinimidylester 28**

Laurinsäure (2.000 g, 9.984 mmol, 1 eq.) und N-Hydroxysuccinimid (1.200 g, 10.500 mmol, 1.05 eq.) wurden in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 mL) gelöst. EDC (2.100 g, 1.100 mmol, 1.1 eq.) wurde bei RT zugegeben und das Gemisch 4 h gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 5%iger (m/m) aq. Zitronensäure (4x 25 mL) gewaschen, getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) und unter vermindertem Druck eingedunstet. Die Titelverbindung wurde als farbloser Feststoff (2.850 g, 9.584 mmol, 96%) erhalten.<sup>[150]</sup>

$R_f(\text{EA: CH}_2\text{Cl}_2 = 1:1) = 0.83;$

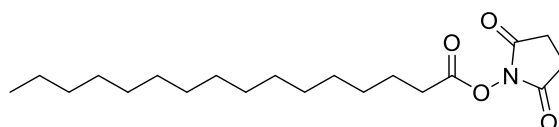
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 2.82$  (d,  $J = 5.0$  Hz, 4H,  $(\text{CH}_2\text{CO})_2\text{N}$ ), 2.59 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.73 (dt,  $J = 15.2, 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.43 – 1.35 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.34 – 1.23 (m, 1H,  $\text{CH}_2$ ), 0.87 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 169.2$  (CON), 168.7 (COO), 31.9 ( $\text{CH}_2$ ), 30.9 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.1 ( $\text{CH}_2$ ), 28.8 ( $\text{CH}_2$ ), 25.6 ( $\text{CH}_2$ ), 24.5 ( $(\text{CH}_2\text{CO})_2\text{N}$ ), 22.6 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 14.1 ( $\text{CH}_3$ );

HRMS (ESI):  $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{H}^+]^+$ :

$m/z$  ber.: 298.2013, gef.: 298.2016.

### Palmitinsäure-*N*-succinimidylester 29



Palmitinsäure (10.095 g, 39.37 mmol, 1 eq.) und *N*-Hydroxysuccinimid (5.038 g, 43.78 mmol, 1.1 eq.) wurden in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) gelöst. Unter Rühren wurde DCC (8.480 g, 41.10 mmol, 1.05 eq.) bei  $0^\circ\text{C}$  zugegeben und das Gemisch über Nacht auf RT erwärmt. Die farblose Suspension wurde über Celite filtriert und der Filtrerrückstand mit EA (75 mL) gewaschen. Das Filtrat wurde unter vermindertem Druck eingeeengt und einer Säulenchromatographie (EA:CH = 1:3) unterworfen. Nach Trocknung wurde die Titelverbindung als farbloser Feststoff (10.389 g, 29.39 mmol, 75%) erhalten.<sup>[150]</sup>

$R_f(\text{EA:CH}=1:1) = 0.59;$

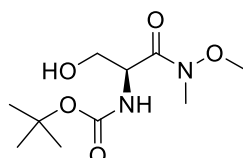
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 2.83$  (bd, 4H,  $J = 5.8$  Hz,  $(\text{CH}_2\text{CO})_2\text{N}$ ), 2.59 (t, 2H,  $J = 7.5$  Hz,  $\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.73 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.39 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.16 – 1.34 (m, 22H,  $\text{CH}_2$ ), 0.87 (t, 3H,  $J = 7.0$  Hz,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 169.2$  (CON), 168.7 (COO), 31.9 ( $\text{CH}_2$ ), 30.9 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.1 ( $\text{CH}_2$ ), 28.8 ( $\text{CH}_2$ ), 25.6 ( $\text{CH}_2$ ), 24.5 ( $(\text{CH}_2\text{CO})_2\text{N}$ ), 22.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 14.1 ( $\text{CH}_3$ );

HRMS (ESI):  $\text{C}_{20}\text{H}_{35}\text{NO}_4\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}^+]^+$ :

$m/z$  ber.: 376.2458, gef.: 376.2457.



**6-8-3 | Sphingosine****(S)-3-Hydroxy-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxopropan-2-ylcarbaminsäure-*tert*-butylester 36**

NaOH (6.300 g, 157.500 mmol, 1.05 eq.) wurde in H<sub>2</sub>O (157.5 mL) gelöst. Bei 0°C, wurde L-Serin (15.764 g, 150.000 mmol, 1 eq.) zugegeben. Di-*tert*-butyl dicarbonat (39.285 g, 180.000 mmol, 1.2 eq.) wurde in 1,4-Dioxan (150 mL) gelöst und bei 0°C über 150 min zur Serin-haltigen Lösung getropft. Es wurde für 1 h bei 0°C und anschließend für 24 h bei RT gerührt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit CH (2x 300 mL) gewaschen. Bei 0°C wurde der pH-Wert durch tropfenweise Zugabe einer 1 M aq. NaHSO<sub>4</sub>-Lösung auf 2 eingestellt. Es wurde mit EA extrahiert (5x 300 mL). Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. aq. NaCl (300 mL) gewaschen, getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtriert und zur Trockne eingeeengt. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde **7** als farbloses, zähes Öl (30.700 g, 149.604 mmol, 1 eq.) erhalten, welches direkt weiter umgesetzt wurde. Dazu wurde es unter einer Ar-Atmosphäre in tr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (290 mL) gelöst. Bei -15°C wurden *N*-Methylmorpholin (18.9 mL, 172.045 mmol, 1.15 eq.) und *N,O*-Dimethylhydroxylaminhydrochlorid (16.052 g, 164.564 mmol, 1.1 eq.) sukzessive hinzugegeben und 10 min gerührt. Anschließend wurde EDC (34.415 g, 179.525 mmol, 1.2 eq.) in sechs Portionen über 30 min zugegeben. Bei -15°C wurde für weitere 90 min gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Eis (200 g) gelöscht und mit 1 M aq. HCl (500 mL) angesäuert. Es wurde mit CHCl<sub>3</sub> (4x 200 mL) extrahiert und die vereinigten organischen Extrakte mit ges. aq. NaHCO<sub>3</sub> und ges. aq. NaCl (je 200 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Extrakte wurden getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), gefiltert und zur Trockne eingeeengt. Die Titelverbindung wurde als farbloser Feststoff (35.633 g, 143.522 mmol, 96% über 2 Stufen) isoliert.

$R_f(\text{EA}) = 0.46;$

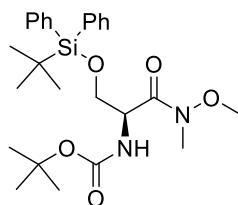
$\alpha(\text{D}, \text{CHCl}_3, \text{RT}, c = 1) = +1.9^\circ;$

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.62 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H, NH), 4.79 (s, 1H, CH), 3.81 (dd,  $J$  = 9.4, 4.5 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.77 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.22 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.76 (s, 1H, OH), 1.44 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 170.8 (CON), 155.9 (COO), 80.0 (C), 63.7 ( $\text{CH}_2$ ), 61.6 ( $\text{CH}_3$ ), 52.3 ( $\text{CH}_3$ ), 32.1 (CH), 28.3 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ );

HRMS (ESI):  $\text{C}_{10}\text{H}_{21}\text{O}_5\text{N}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z$  ber.: 249.1445, gef.: 249.1447,  
 $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_5\text{N}_2\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :  $m/z$  ber.: 271.1264, gef.: 271.1264.

**(S)-N-Methoxy-N-methyl-3-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-(*N*-*tert*-butyloxycarbonyl)aminopropanamid 37**



Unter einer Ar-Atmosphäre wurden **36** (35.550 g, 143.187 mmol, 1 eq.), Imidazol (29.244 g, 429.561 mmol, 3 eq.) und DMAP (0.875 g, 7.159 mmol, 0.05 eq.) in tr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (300 mL) gelöst. Bei  $0^\circ\text{C}$  wurde die Reaktionsmischung über einen Zeitraum von 30 min tropfenweise mit *tert*-Butyldiphenylchlorsilan (41.0 mL, 157.506 mmol, 1.1 eq.) versetzt. Es wurde für weitere 24 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch tropfenweise Zugabe von MeOH (20 mL) beendet und mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (250 mL) verdünnt. Die organische Phase wurde mit 2x 0.1 M aq. HCl, ges. aq.  $\text{NaHCO}_3$  und ges. aq. NaCl (je 250 mL, Rückextraktion mit je 20 mL  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) gewaschen. Die vereinigten organischen Extrakte wurden getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), gefiltert und zur Trockne eingeeengt. Säulenchromatographie (CH:EA = 98:2  $\rightarrow$  90:10) ergab die Titelverbindung als farbloses Öl, welches nach längerem Stehen erstarrte (67.650 g, 139.125 mmol, 97%).

$R_f(\text{CH:EA} = 3:2) = 0.57$ ;

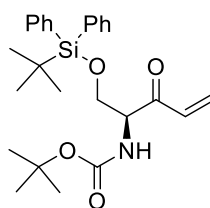
$\alpha(\text{D, CHCl}_3, \text{RT}, c = 1) = +16.2^\circ$ ;

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.67 – 7.61 (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.44 – 7.34 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 5.41 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, NH), 4.83 (s, 1H, CH), 3.86 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.65 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 3.19 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 1.44 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.03 (s, 9H,  $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 155.4 (CONMe), 135.6 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 133.1 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 127.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 79.5 ( $\text{CMe}_3$ ), 64.1 ( $\text{CH}_2\text{OSi}$ ), 61.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 52.4 ( $\text{CHCO}$ ), 32.1 ( $\text{NCH}_3$ ), 28.4 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.7 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 19.2 ( $\text{SiCMe}_3$ );

HRMS (ESI):  $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{O}_5\text{N}_2\text{Si}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z$  ber.: 487.2623, gef.: 487.2623,  
 $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_5\text{N}_2\text{SiNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :  $m/z$  ber.: 509.2442, gef.: 509.2439.

**(S)-1-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-(*N*-*tert*-butyloxycarbonyl)aminopent-4-en-3-on 38**



Unter einer Ar-Atmosphäre wurde **37** (14.400 g, 29.614 mmol, 1 eq.) in tr. THF (98 mL) gelöst. Die Reaktionsmischung wurde mit Hilfe von Eis/NaCl auf  $-15^\circ\text{C}$  gekühlt und Vinylmagnesiumbromid (1 M in THF, 98 mL, 98.000 mmol, 3.3 eq.) über einen Zeitraum von 2 h zugetropft, sodass die Temperatur  $-15^\circ\text{C}$  nicht überstieg. Bei der gleichen Temperatur wurde für 1 h weiter gerührt, dann auf RT erwärmt und für weitere 90 min gerührt. Nach DC-Kontrolle auf Vollständigkeit des Umsatzes wurde die Reaktion gelöscht, indem sie tropfenweise über einen Zeitraum von 30 min in eine Mischung aus Eis/1 M HCl (je 350 mL) kanüliert wurde. Die wässrige Reaktionsmischung wurde mit EA (4x 150 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit ges. aq.  $\text{NaHCO}_3$  und ges. aq. NaCl (je 100 mL) gewaschen, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), gefiltert und zur Trockne eingeeengt. Säulenchromatographie (CH:EA = 96:4  $\rightarrow$  91:9) ergab die Titelverbindung als farbloses Öl, das nach längerem Stehen erstarrte (10.220 g, 22.529 mmol, 76%).

$R_f(\text{CH:EA} = 4:1) = 0.56$ ;

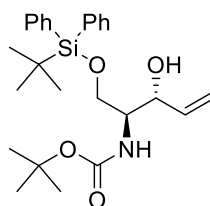
$\alpha(\text{D, CHCl}_3, \text{RT}, c = 1) = +56.8^\circ$ ;

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.63 – 7.56 (m, 4H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.47 – 7.41 (m, 2H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.37 (ddd,  $J$  = 8.1, 5.2, 2.1 Hz, 4H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.51 (dd,  $J$  = 17.5, 10.6 Hz, 1H, =CH), 6.34 (d,  $J$  = 17.4 Hz, 1H, =CHH), 5.82 (d,  $J$  = 10.6 Hz, 1H, =CHH), 5.59 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, NH), 4.67 (dt,  $J$  = 7.6, 3.7 Hz, 1H, CHNH), 4.00 (dd,  $J$  = 10.5, 3.5 Hz, 1H, CHHOSi), 3.93 (dd,  $J$  = 10.5, 4.0 Hz, 1H, CHHOSi) 1.45 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 1.00 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 196.6 (CO), 155.3 (COO), 135.6 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 135.5 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 133.1 ( $\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 132.8 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 132.7 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 129.8 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.8 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.6 ( $\text{CH}_2=\text{CH}$ ), 127.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 79.8 ( $\text{CMe}_3$ ), 64.2 (CHNH), 59.4 ( $\text{CH}_2\text{OSi}$ ), 28.3 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 26.7 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 19.2 ( $\text{Me}_3\text{CSi}$ );

HRMS (ESI):  $\text{C}_{26}\text{H}_{36}\text{O}_4\text{NSi}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z$  ber.: 454.2408, gef.: 454.2399,  
 $\text{C}_{26}\text{H}_{35}\text{O}_4\text{NSiNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :  $m/z$  ber.: 476.2228, gef.: 476.2217.

**(2*S*,3*R*)-1-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-(*N*-*tert*-butyloxycarbonyl)aminopent-4-en-3-ol 39**



Unter einer Ar-Atmosphäre wurde **38** (7.738 g, 17.058 mmol, 1 eq.) in tr. THF (6 mL) gelöst. Zugabe von tr. EtOH (60 mL) unter kräftigem Rühren ergibt eine feine Aufschlammung, welche auf  $-84^\circ\text{C}$  (EA/ $\text{N}_2(\text{l})$ ) gekühlt wurde und bei ebendieser Temperatur über einen Zeitraum von 20 min mit TBLAH (8.674 g, 34.115 mmol, 2.0 eq.) versetzt wurde. Es wurde für 4 h bei dieser Temperatur gerührt. Die Reaktion wurde gelöscht, indem sie bei  $-84^\circ\text{C}$  tropfenweise mit 1 M HCl (75 mL) versetzt wurde. Die Reaktionsmischung wurde auf RT erwärmt und unter Rühren Celite zugegeben. Die Aufschlammung wurde über Celite gefiltert und der Filtrerrückstand mit EA (200 mL) gewaschen. Das vereinigte Filtrat wurde mit ges. aq.  $\text{NaHCO}_3$  und ges. aq. NaCl (je 100 mL) gewaschen, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), gefiltert und zur Trockne eingengt. Säulenchromatographie (CH:EA = 92:8) ergab die Titelverbindung als farbloses Öl (6.110 g, 13.416 mmol, 79%).

$R_f(\text{CH:EA} = 7:3) = 0.57$ ;

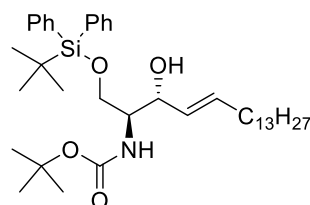
$\alpha(\text{D, CHCl}_3, \text{RT}, c = 1) = +14.7^\circ$  (vgl. **ent-39**<sup>[186]</sup>:  $\alpha(\text{D, CHCl}_3, 22^\circ\text{C}, c = 1.2) = -18.1^\circ$ );

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 7.69 - 7.62$  (m, 4H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ),  $7.48 - 7.37$  (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ),  $5.91$  (ddd,  $J = 17.2, 10.6, 5.0$  Hz, 1H,  $=\text{CH}$ ),  $5.42$  (dt,  $J = 17.2, 1.6$  Hz, 1H,  $=\text{CHH}$ ),  $5.34 - 5.21$  (m, 2H,  $=\text{CHH} + \text{NH}$ ),  $4.32$  (t,  $J = 4.6$  Hz, 1H,  $\text{CHOH}$ ),  $3.91$  (dd,  $J = 10.5, 3.6$  Hz, 1H,  $\text{CHHOSi}$ ),  $3.77$  (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H,  $\text{CHHOSi}$ ),  $3.72$  (d,  $J = 3.7$  Hz, 1H,  $\text{CHNH}$ ),  $3.12$  (s, 1H, OH),  $1.46$  (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ),  $1.08$  (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 155.8$  (NCOO),  $137.6$  ( $=\text{CH}$ ),  $135.5$  ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ),  $132.4$  ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ),  $132.4$  ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ),  $129.9$  ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ),  $129.9$  ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ),  $127.8$  ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ),  $116.0$  ( $=\text{CH}_2$ ),  $79.5$  ( $\text{Me}_3\text{CO}$ ),  $74.5$  ( $\text{CHOH}$ ),  $64.0$  ( $\text{CH}_2\text{O}$ ),  $54.7$  ( $\text{CHNH}$ ),  $28.3$  ( $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ),  $26.8$  ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ),  $19.1$  ( $\text{Me}_3\text{CSi}$ );

HRMS (ESI):  $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_4\text{NSi}$   $[\text{M} + \text{H}]^+$ :  $m/z$  ber.: 456.2565, gef.: 456.2567,  
 $\text{C}_{26}\text{H}_{37}\text{O}_4\text{NSiNa}$   $[\text{M} + \text{Na}]^+$ :  $m/z$  ber.: 478.2384, gef.: 478.2388.

**(2*S*,3*R*,*E*)-1-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-(*N*-*tert*-butyloxycarbonyl)amino-octa-dec-4-en-3-ol 40**



Unter einer Ar-Atmosphäre wurde **39** (0.970 g, 2.129 mmol, 1 eq.) und Pentadec-1-en (2.6 mL, 9.579 mmol, 4.5 eq.) in tr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) gelöst. GRUBBS-Katalysator der zweiten Generation (0.054 g, 0.064 mmol, 0.03 eq.) wurde in tr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) gelöst und zur Lösung der Alkene getropft. Die Reaktionsmischung wurde 4 h unter Rückfluss erhitzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe einer Lösung von Kalium-2-isocyanoacetat (0.035 g, 0.281 mmol, 0.13 eq.) in MeOH (1 mL) beendet. Anschließend wurden die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographie (CH:EA = 19:1  $\rightarrow$  15:1  $\rightarrow$  14:1  $\rightarrow$  10:1) ergab die Titelverbindung als farbloses Öl (0.740 g, 1.155 mmol, 54%).

$R_f(\text{CH:EA} = 4:1) = 0.54$ ;

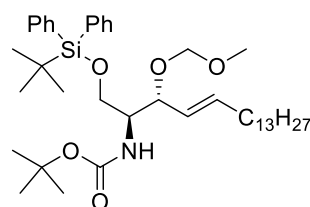
$\alpha(\text{D, CHCl}_3, \text{RT}, c = 1) = +11.1^\circ$ ;

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.67 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 4H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.55 – 7.29 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 5.80 (dt,  $J$  = 15.3, 6.6 Hz, 1H,  $=\text{CHCH}_2$ ), 5.51 (dd,  $J$  = 15.4, 5.9 Hz, 1H,  $=\text{CHCH}$ ), 5.24 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, NH), 4.27 (t,  $J$  = 4.9 Hz, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 3.93 (dd,  $J$  = 10.5, 3.7 Hz, 1H,  $\text{CHHO}$ ), 3.79 (d,  $J$  = 10.2 Hz, 1H,  $\text{CHHO}$ ), 3.69 (s, 1H,  $\text{CHNH}$ ), 3.19 (s, 1H, OH), 2.05 (q,  $J$  = 6.9 Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$ ), 1.47 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 1.42 – 1.35 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{Me}$ ), 1.29 (s, 20H, 10x  $\text{CH}_2$ ), 1.09 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.90 (t,  $J$  = 6.7 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (101 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 155.7 (COO), 135.4 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 133.1 ( $=\text{CHCH}_2$ ), 132.5 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 132.9 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 129.8 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.8 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.1 ( $=\text{CHCH}$ ), 127.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 79.3 ( $\text{OCMe}_3$ ), 74.1 ( $\text{CHOH}$ ), 63.9 ( $\text{CH}_2\text{OSi}$ ), 55.0 ( $\text{CHNH}$ ), 32.2 ( $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$ ), 31.8 ( $\text{CH}_2\text{Et}$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.2 ( $\text{CH}_2$ ), 29.1 ( $\text{CH}_2$ ), 28.3 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 26.8 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 22.6 ( $\text{CH}_2\text{Me}$ ), 19.1 ( $\text{SiCMe}_3$ ), 14.0 ( $\text{CH}_3$ );

HRMS (ESI):  $\text{C}_{39}\text{H}_{64}\text{O}_4\text{NSi}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$ :  $m/z$  ber.: 638.4599, gef.: 638.4593,  
 $\text{C}_{39}\text{H}_{63}\text{O}_4\text{NSiNa}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :  $m/z$  ber.: 660.4419, gef.: 660.4410.

**(2*S*,3*R*,*E*)-1-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(methoxymethoxy)octadec-4-en-2-yl-carbaminsäure-*tert*-butylester 41**



Unter einer Ar-Atmosphäre wurde **40** (0.595 g, 0.933 mmol, 1 eq.) in tr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.7 mL) gelöst. Bei  $0^\circ\text{C}$  wurde tr. DIPEA (0.4 mL, 2.331 mmol, 2.5 eq.) addiert und MOMCl (0.17 mL, 2.238 mmol, 2.4 eq.) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde über Nacht bei RT gerührt. Nachdem DC-Kontrolle einen vollständigen Umsatz des Edukts zeigte, wurde die Lösung mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (20 mL) verdünnt und mit 1 M aq.  $\text{NaHCO}_3$ , 1 M aq.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  und ges. aq. NaCl (je 20 mL) gewaschen. Die vereinigten organischen Extrakte wurden getrocknet ( $\text{NaSO}_4$ ) und zur Trockne eingengt. Säulenchromatographie ( $\text{CH}:\text{EA} = 96:4$ ) lieferte die Titelverbindung als farbloses Öl (0.605 g, 0.888 mmol, 95%).

$R_f(\text{CH}:\text{EA} = 4:1) = 0.74$ ;

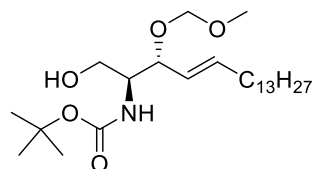
$\alpha(\text{D}, \text{CHCl}_3, \text{RT}, c = 1) = -30.9^\circ$ ;

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 7.66 (ddd,  $J$  = 13.6, 7.9, 1.4 Hz, 4H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 7.48 – 7.33 (m, 6H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 5.76 – 5.60 (m, 1H,  $=\text{CHCH}_2$ ), 5.28 (dd,  $J$  = 15.5, 8.3 Hz, 1H,  $=\text{CHCH}$ ), 4.74 (d,  $J$  = 8.9 Hz, 1H, NH), 4.66 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H,  $\text{CHHOME}$ ), 4.49 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H,  $\text{CHHOME}$ ), 4.16 (dd,  $J$  = 7.9, 6.7 Hz, 1H,  $\text{CHHOSi}$ ), 3.92 – 3.83 (m, 1H,  $\text{CHHOSi}$ ), 3.77 (m, 2H,  $\text{OCHCHNH}$ ), 3.28 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ), 2.00 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.43 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 1.33 (d,  $J$  = 9.9 Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.31 – 1.21 (m, 20H, 10x  $\text{CH}_2$ ), 1.08 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 0.88 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 155.4 ( $\text{COO}$ ), 136.8 ( $=\text{CHCH}_2$ ), 135.6 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 133.4 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 129.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 127.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 126.5 ( $=\text{CHCH}$ ), 93.7 ( $\text{OCH}_2\text{O}$ ), 78.9 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CO}$ ), 76.6 ( $\text{CHO}$ ), 62.6 ( $\text{CH}_2\text{OSi}$ ), 55.5 ( $\text{OCH}_3$ ), 55.0 ( $\text{CHNH}$ ), 32.3 ( $\text{CH}_2\text{CH}=\text{}$ ), 31.9 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 29.2 ( $\text{CH}_2$ ), 29.1 ( $\text{CH}_2$ ), 28.4 ( $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.9 ( $\text{CH}_2$ ), 22.7 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 19.3 ( $(\text{CH}_3)_3\text{CSi}$ ), 14.1 ( $\text{CH}_3$ );

HRMS (ESI): $\text{C}_{41}\text{H}_{68}\text{O}_5\text{NSi}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ :	$m/z$ ber.: 682.4861, gef.: 682.4857,
$\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{O}_5\text{NSiNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	$m/z$ ber.: 704.4681, gef.: 704.4679,
$\text{C}_{41}\text{H}_{67}\text{O}_5\text{NSiK}$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ :	$m/z$ ber.: 720.4420, gef.: 720.4419.

#### **(2*S*,3*R*,*E*)-1-hydroxy-3-(methoxymethoxy)octadec-4-en-2-ylcarbaminsäure-*tert*-butylester 42**



Bei RT wurde **41** (0.793 g, 1.163 mmol, 1 eq.) in THF (2.5 mL) gelöst. Eine zweite Lösung aus Tetrabutylammoniumfluoridtrihydrat (0.734 g, 2.326 mmol, 2 eq.) in THF (2 mL) wurde unter Rühren tropfenweise zugegeben. Es wurde bei RT gerührt bis DC-Kontrolle vollständigen Umsatz des Eduktes zeigte (3 h).  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL) wurde addiert und die Reaktionsmischung mit  $\text{H}_2\text{O}$  und 2x ges. aq. NaCl (je 20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), gefiltert und zur Trockne eingedunstet. Säulenchromatographie ( $\text{CH}:\text{EA} = 5:1$ ) lieferte die Titelverbindung (0.500 g, 1.117 mmol, 96%) als farbloses Wachs.

$R_f(\text{CH}:\text{EA} = 1:1) = 0.62$ ;

$\alpha(\text{D, CHCl}_3, \text{RT}, c = 1) = -55.6^\circ$ ;

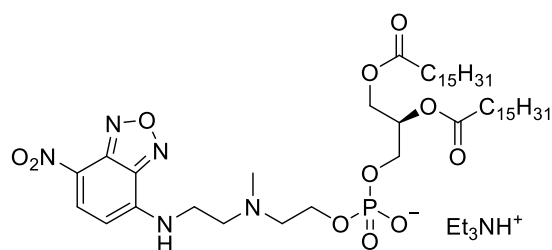
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 5.75 (dt,  $J$  = 14.1, 6.7 Hz, 1H, =CHCH<sub>2</sub>), 5.35 (dd,  $J$  = 15.5, 7.9 Hz, 1H, =CHCH), 5.23 (d,  $J$  = 6.9 Hz, 1H, NH), 4.66 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, OCHHOMe), 4.52 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, OCHHOMe), 4.23 (dd,  $J$  = 7.5, 4.9 Hz, 1H, CHO), 3.94 (dt,  $J$  = 11.6, 3.4 Hz, 1H, CHHOH), 3.70 – 3.57 (m, 2H, CHHOH+CHNH), 3.38 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.75 (d,  $J$  = 7.1 Hz, 1H, OH), 2.05 (q,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.44 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 1.40 – 1.32 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.32 – 1.19 (m, 20H, 10x CH<sub>2</sub>), 0.87 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>);

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 155.9 (COO), 137.0 (=CHCH<sub>2</sub>), 125.9 (=CHCH), 93.9 (OCH<sub>2</sub>O), 79.5 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 78.6 (CHO), 62.4 (CH<sub>2</sub>OH), 55.7 (OCH<sub>3</sub>), 54.9 (CHNH), 32.3 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 28.4 ((CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO), 22.7 (CH<sub>2</sub>Me), 14.1 (CH<sub>3</sub>);

HRMS (ESI):	$\text{C}_{25}\text{H}_{50}\text{O}_5\text{N}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ :	$m/z$ ber.: 444.3684, gef.: 444.3686,
	$\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{O}_5\text{NNa}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :	$m/z$ ber.: 466.3503, gef.: 466.3502,
	$\text{C}_{25}\text{H}_{49}\text{O}_5\text{NK}$ $[\text{M}+\text{K}]^+$ :	$m/z$ ber.: 482.3242, gef.: 482.3244.

#### 6-8-4 | Phosphatide

##### Triethylammonium-(*R*)-2,3-bis(hexadecanoyloxy)propyl-2-(methyl[2-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino)ethyl]amino)ethylphosphat 6



(*R*)-2,3-Bis(hexadecanoyloxy)propyl-1-*H*-phosphonsäure<sup>[91]</sup> (0.076 g, 0.103 mmol, 1 eq.) und **13** wurden unter einer Ar-Atmosphäre gemeinsam in tr. Pyridin gelöst und durch Koevaporation getrocknet. Der Rückstand wurde in tr. Pyridin (1 mL) gelöst und NPCI (0.050 g, 0.206 mmol, 2 eq.) zugegeben. Nach 15 min wurde I<sub>2</sub> (0.052 g, 0.206 mmol, 2 eq.) in Pyridin:H<sub>2</sub>O = 98:2 (2 mL) zugegeben und 5 min bei RT gerührt. Die Lösung wurde mit 5% (*m/m*) aq. NaHSO<sub>3</sub> gewaschen (10 mL) und mit CHCl<sub>3</sub> (30 mL) reextrahiert. Die organische Phase wurde mit Celite versetzt und unter vermindertem Druck



getrocknet. Säulenchromatographie ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NEt}_3 = 90:10:0.1 \rightarrow 86:14:0.1$ ) lieferte die Titelverbindung in Form eines gelben Feststoffs (0.060 g, 0.059 mmol, 57%).

$R_f(\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{NEt}_3 = 89:10:2) = 0.38$ ;

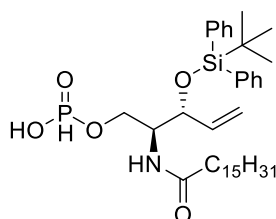
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 11.93$  (s, 1H, POH), 8.30 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{ar,NBD}}$ ), 6.19 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{ar,NBD}}$ ), 5.21 (s, 1H, CH), 5.00 – 3.16 (m, 12H, 6x  $\text{CH}_2$ ), 3.10 (q,  $J = 7.3$  Hz, 6H, 3x  $\text{NCH}_2$ ), 2.23 (s, 4H, 2x  $\text{CH}_2$ ), 1.79 – 1.44 (m, 4H, 2x  $\text{CH}_2$ ), 1.40 (t,  $J = 7.3$  Hz, 9H, 3x  $\text{CH}_3$ ), 1.23 (s, 48H, 24x  $\text{CH}_2$ ), 0.86 (t,  $J = 6.8$  Hz, 6H, 2x  $\text{CH}_3$ );

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = -4.31$  (s, 1P);

MS (ESI):	$\text{C}_{46}\text{H}_{83}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$ [M- $\text{NEt}_3+\text{H}$ ]:	$m/z$ ber.: 912.5821, gef.: 912.7,
	$\text{C}_{46}\text{H}_{81}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$ [M- $\text{HNEt}_3$ ]:	$m/z$ ber.: 910.5676, gef.: 910.7.

## 6-8-5 | Sphingosylphosphate

### (2*S*,3*R*)-3-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-hexadecanoylamino-pent-4-enyl-1-*H*-phosphonsäure 45



In Analogie zu Literaturvorschriften<sup>[186]</sup> wurden Phosphonsäure (0.538 g, 6.560 mmol, 5 eq.) und (2*S*,3*R*)-3-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-hexadecanoylamino-pent-4-en-1-ol **44** (0.780 g, 1.313 mmol, 1 eq.) einzeln in tr. Pyridin gelöst und durch Koevaporation getrocknet. Beide wurden getrennt voneinander unter einer Ar-Atmosphäre in tr. Pyridin (jeweils 3 mL) gelöst und 2-Chloro-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxid (NPCl, 0.606 g, 3.283 mmol, 2.5 eq.) bei RT zur Phosphonsäure-haltigen Lösung gegeben. Nach 5 min klarte die Lösung auf und wurde bei RT tropfenweise über einen Zeitraum von 10 min zur Alkoholkomponente **44** gegeben. Es wurde für 15 h bei RT gerührt, bevor die Reaktion durch Zugabe einer Mischung von  $\text{NEt}_3$  (3.6 mL) und  $\text{H}_2\text{O}$  (1.7 mL) beendet wurde. Nach 10 min Rühren wurde die Suspension zur Trockne eingedunstet. Der Rückstand wurde in THF (35 mL) aufgenommen, gefiltert und der Filtrückstand mit THF (70 mL)

gewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Trockne eingengt und mittels Säulenchromatographie (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 10:1) aufgereinigt. Die produkthaltigen Fraktionen wurden vereint und unter vermindertem Druck getrocknet. Die Titelverbindung wurde als farbloser wachsartiger Feststoff (0.761 g, 1.157 mmol, 88 %) isoliert.

$R_f(\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 100:15:1) = 0.22$ ;

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 7.85 – 7.70 (m, 4H, CH<sub>ar</sub>), 7.64 – 7.46 (m, 6H, CH<sub>ar</sub>), 6.74 (d,  $J^{PH} = 649.7$  Hz, 1H, PH), 5.90 (ddd,  $J = 17.4, 10.4, 7.2$  Hz, 1H, =CHCH), 5.13 (d,  $J = 10.5$  Hz, 1H, =CHH), 5.07 (d,  $J = 17.2$  Hz, 1H, =CHH), 4.60 – 4.38 (m, 1H, CHOSi), 4.31 (dd,  $J = 11.0, 5.0$  Hz, 1H, CH), 4.13 – 3.94 (m, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 2.37 – 2.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.76 – 1.54 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.38 (s, 24H, 12x CH<sub>2</sub>), 1.18 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.00 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>);

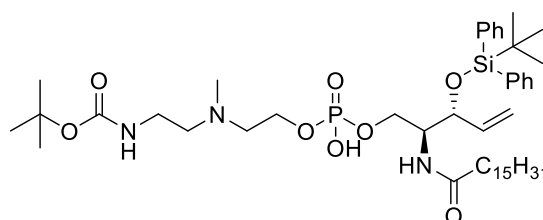
<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 174.4 (COO), 136.5 (=CH), 135.7 (C<sub>ar</sub>), 135.7 (C<sub>ar</sub>), 133.2 (CH<sub>ar</sub>), 133.0 (CH<sub>ar</sub>), 129.7 (CH<sub>ar</sub>), 129.6 (CH<sub>ar</sub>), 127.5 (CH<sub>ar</sub>), 127.3 (CH<sub>ar</sub>), 117.6 (=CH<sub>2</sub>), 74.7 (CHOSi), 62.1 (CH<sub>2</sub>OP), 53.9 (CHNH), 36.2 (CH<sub>2</sub>), 31.7 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 26.7 (SiC(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 25.4 (CH<sub>2</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>), 19.1 (SiCMe<sub>3</sub>), 13.8 (CH<sub>3</sub>).

<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 7.46 (d, 1P,  $J^{PH} = 649.3$  Hz);

HRMS (ESI): C<sub>37</sub>H<sub>59</sub>NO<sub>5</sub>P<sup>−</sup> [M-H]<sup>−</sup>:

$m/z$  ber.: 656.3906, gef.: 656.3903.

***N*-2-{2-[(2*S*,3*R*)-3-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-hexadecanoylamino]pent-4-enyl-1-phospho}ethyl(methyl)amino}ethylcarbaminsäure-*tert*-butylester 46**



**45** (0.092 g, 0.140 mmol, 1 eq.) wurde in tr. Pyridin gelöst und durch Koevaporation getrocknet. Unter einer Ar-Atmosphäre wurde der Rückstand in tr. Pyridin:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1:9 (insgesamt 1.4 mL) gelöst. 2-Chloro-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxid (NPCl, 0.077 g, 0.420 mmol, 3 eq.) wurde bei RT zur Phosphonsäure gegeben. Nach 10 min klarte die Lösung auf. 2-[(2-Hydroxyethyl)(methyl)amino]ethylcarbaminsäure-*tert*-butylester

**12** (0.061 g, 0.280 mmol, 2 eq.) wurde zugetropft und für 90 min bei RT gerührt. Nachdem HPLC-MS hohen Umsatz des Edukts anzeigte, wurde  $\text{Bu}_4\text{NIO}_4$  (0.061 g, 0.140 mmol, 1 eq.) zugegeben und für 18 h bei RT gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5% (*m/m*) aq.  $\text{NaHSO}_3$  (6 mL) beendet, worauf sich die Reaktionsmischung gelb färbte. Die Lösung wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4x 10 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Extrakte wurden mit 1 M aq.  $\text{KHSO}_4$  (5 mL) gewaschen, getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), gefiltert und zur Trockne eingengt. Säulenchromatographie ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 84:15:1$ ) lieferte die Titelverbindung als farblosen wachsartigen Feststoff (0.087 g, 0.100 mmol, 72%).

$R_f(\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 84:15:1) = 0.38$ ;

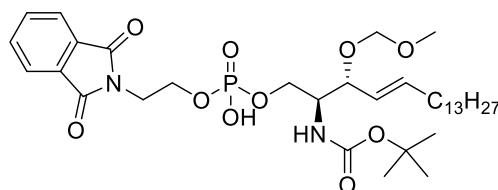
$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 7.68 - 7.21$  (m, 10H, 2x  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 6.42 (bs, 1H, POH), 6.25 (bs, 1H, NH), 5.75 (ddd,  $J = 17.1, 10.5, 6.8$  Hz, 1H,  $=\text{CHCH}_2$ ), 4.94 (d,  $J = 10.1$  Hz, 1H,  $=\text{CHCHH}$ ), 4.92 (d,  $J = 17.1$  Hz, 1H,  $=\text{CHCHH}$ ), 4.47-4.36 (bs, <1H, NH), 4.34 – 4.18 (m, 1H,  $\text{CHOSi}$ ), 4.17 – 3.79 (m, 5H, 2x  $\text{CH}_2\text{OP} + \text{CHNH}$ ), 3.41 (d,  $J = 5.0$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 3.09 (s, 4H, 2x  $\text{CH}_2$ ), 2.73 (s,  $J = 8.1$  Hz, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.00 – 1.76 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.40 (dd,  $J = 14.8, 7.4$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.35 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.26 – 1.12 (m, 24H, 12x  $\text{CH}_2$ ), 0.97 (s, 9H,  $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 0.81 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 173.4$  (CONH), 156.3 (NCOO), 135.9 ( $=\text{CH}$ ), 133.8 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 133.3 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 129.8 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 129.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 127.7 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 127.5 ( $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 117.5 ( $=\text{CH}_2$ ), 79.6 ( $\text{OCMe}_3$ ), 75.0 ( $\text{CHOSi}$ ), 64.3 (d,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 59.6 (d,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 59.1 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 56.3 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 54.2 ( $\text{CHNH}$ ), 41.5 ( $\text{NCH}_3$ ), 36.7 ( $\text{CH}_2$ ), 35.7 ( $\text{CH}_2$ ), 31.9 ( $\text{CH}_2\text{Et}$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 29.3 ( $\text{CH}_2$ ), 28.4 ( $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$ ), 27.0 ( $\text{SiC}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.6 ( $\text{CH}_2$ ), 22.6 ( $\text{CH}_2$ ), 19.4 ( $\text{SiCMe}_3$ ), 14.1 ( $\text{CH}_3$ );

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta = 0.16$  (s, 1P);

HRMS (ESI): $\text{C}_{47}\text{H}_{79}\text{N}_3\text{O}_8\text{PSi}$ [ $\text{M}-\text{H}$ ] $^-$ :	$m/z$ ber.: 872.5380, gef.: 872.5392,
$\text{C}_{47}\text{H}_{80}\text{N}_3\text{O}_8\text{PSiNa}$ [ $\text{M}+\text{Na}$ ] $^+$ :	$m/z$ ber.: 896.5345, gef.: 896.5340.

***N*-[(2*S*,3*R*,*E*)-2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-3-(methoxymethoxy)octadec-4-en-1-phosphoethyl]isoindolin-1,3-dion **49****



Unter einer Ar-Atmosphäre wurde **18** (1.205 g, 3.913 mmol, 4 eq.) in tr. Pyridin:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> = 1:25 (insg. 50 mL) gelöst. Bei 0°C wurde eine Lösung von **42** (0.434 g, 0.978 mmol, 1 eq.) in tr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (48 mL) über einen Zeitraum von 60 min zugetropft. Bei 0°C wurde für weitere 3.5 h gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von ges. aq. NaHCO<sub>3</sub> (18 mL) beendet und für 20 min bei RT gerührt. CHCl<sub>3</sub> (300 mL), MeOH (150 mL) und H<sub>2</sub>O (300 mL) wurden zugegeben, die organische Phase abgetrennt und eingengt. Säulenchromatographie (MeOH:CHCl<sub>3</sub> = 1:10 → 1:1) lieferte die Titelverbindung als elfenbeinfarbenen wachsartigen Feststoff (0.605 g, 0.868 mmol, 89%).

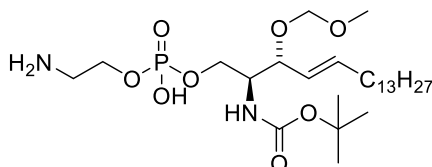
$R_f(\text{CHCl}_3:\text{MeOH} = 85:15) = 0.26;$

$\alpha(\text{D, MeOH, RT, } c = 1) = -49.5^\circ;$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 7.87 – 7.84 (m, 2H, CH<sub>ar</sub>), 7.81 – 7.78 (m, 2H, CH<sub>ar</sub>), 5.72 (dt,  $J$  = 14.9, 6.7 Hz, 1H, =CHCH<sub>2</sub>), 5.31 (dd,  $J$  = 15.4, 8.6 Hz, 1H, =CHCH), 4.65 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, CHHOMe), 4.47 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 1H, CHHOMe), 4.10 (q,  $J$  = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.04 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, CHOH), 3.97 (dd,  $J$  = 10.3, 5.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.93 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.70 (dd,  $J$  = 10.6, 6.1 Hz, 1H, CHNH), 3.33 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.05 (dd,  $J$  = 13.7, 6.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.40 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.36 – 1.21 (m, 20H, 10x CH<sub>2</sub>), 0.90 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 169.6 (CON), 157.9 (COO), 138.3 (=CHCH<sub>2</sub>), 135.4 (CH<sub>ar</sub>), 133.4 (C<sub>ar</sub>), 128.0 (=CHCH), 124.2 (CH<sub>ar</sub>), 94.6 (OCH<sub>2</sub>O), 80.0 (CMe<sub>3</sub>), 77.7 (CHO), 65.5 (d,  $J$  = 5.2 Hz, CH<sub>2</sub>OP), 63.3 (d,  $J$  = 5.5 Hz, CH<sub>2</sub>OP), 56.0 (OCH<sub>3</sub>), 55.6 (d,  $J$  = 7.8 Hz, NCHCH<sub>2</sub>OP), 39.6 (d,  $J$  = 8.6 Hz, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 33.4 (CH<sub>2</sub>CH=), 33.1 (CH<sub>2</sub>), 30.8 (CH<sub>2</sub>), 30.8 (CH<sub>2</sub>), 30.8 (CH<sub>2</sub>), 30.7 (CH<sub>2</sub>), 30.6 (CH<sub>2</sub>), 30.5 (CH<sub>2</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 30.3 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 23.7 (CH<sub>2</sub>Me), 14.4 (CH<sub>3</sub>);

<sup>31</sup>P-NMR (202 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = -0.91 (s, 1P);

HRMS (ESI):  $C_{35}H_{56}N_2O_{10}P$  [M-H] $^-$ : $m/z$  ber.: 695.3673, gef.: 695.3683.**(2*S*,3*R*,*E*)-2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-3-(methoxymethoxy)octadec-4-en-1-phosphoethylamin 50**

**49** (0.364 g, 0.522 mmol, 1 eq.) wurde in MeOH (10.6 mL) gelöst und mit Hydrazinhydrat (64%, 153  $\mu$ L, 3.134 mmol, 6 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde bei RT für 4.5 h gerührt bis DC vollständigen Eduktumsatz anzeigte. Das Lösungsmittel wurde entfernt und der Rückstand in  $CHCl_3$  aufgenommen. Celite wurde zugegeben und die flüchtigen Bestandteile im Grobvakuum entfernt. Mittels Säulenchromatographie ( $CHCl_3$ :MeOH:H $_2$ O = 100:15:1  $\rightarrow$  65:25:3) wurde die Titelverbindung in Form eines farblosen glasartigen Feststoffs isoliert (0.280 g, 0.502 mmol, 96%).

 $R_f(CHCl_3:MeOH:H_2O = 65:25:3) = 0.45$ ;

 $\alpha(D, MeOH, RT, c = 1) = -37.9^\circ$ ;

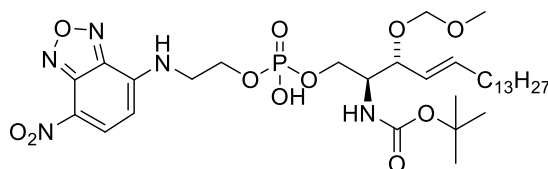
$^1H$ -NMR (500 MHz, Pyridin- $d_5$ )  $\delta$  = 9.59 (bs, 2H,  $H_{ex}$ ), 7.77 (dd,  $J$  = 5.9, 3.3 Hz, 1H,  $H_{ex}$ ), 5.97 – 5.75 (m, 1H, =CHCH $_2$ ), 5.70 (dd,  $J$  = 15.3, 8.2 Hz, 1H, =CHCH), 4.94 (d,  $J$  = 6.4 Hz, 1H, OCHHO), 4.75 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 1H, OCHHO), 4.56 (m, 5H, 2x CH $_2$ OP+CHO), 4.39 (s, 1H, CHNH), 3.62 (s, 1H, NH), 3.51 (bs, 5H, CH $_2$ NH $_2$ +OCH $_3$ ), 2.09 (s, 2H, CH $_2$ ), 1.57 (s, 9H, (CH $_3$ ) $_3$ CO), 1.41 (s, 2H, CH $_2$ ), 1.35 – 1.22 (m, 20H, 10x CH $_2$ ), 0.90 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, CH $_3$ );

$^{13}C$ -NMR (126 MHz, Pyridin- $d_5$ )  $\delta$  = 157.2 (NHCOO), 137.4 (=CHCH $_2$ ), 128.1 (CHCH=), 94.4 (CH $_2$ OMe), 78.8 (CMe $_3$ ), 77.5 (CHO), 65.9 (CH $_2$ OP), 63.2 (CH $_2$ OP), 56.1 (OCH $_3$ ), 55.8 (CHNH), 41.4 (CH $_2$ NH $_2$ ), 33.2 (CH $_2$ CH=), 32.6 (CH $_2$ Et), 30.5 (CH $_2$ ), 30.5 (CH $_2$ ), 30.4 (CH $_2$ ), 30.4 (CH $_2$ ), 30.3 (CH $_2$ ), 30.1 (CH $_2$ ), 30.1 (CH $_2$ ), 29.9 (CH $_2$ ), 29.2 (C(CH $_3$ ) $_3$ ), 23.4 (CH $_2$ Me), 14.8 (CH $_2$ CH $_3$ );

 $^{31}P$ -NMR (202 MHz, Pyridin- $d_5$ )  $\delta$  = 1.22 (s, 1P);

HRMS (ESI): C<sub>27</sub>H<sub>56</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>P [M+H]<sup>+</sup>:*m/z* ber.: 567.3769, gef.: 567.3783,C<sub>27</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>P [M-H]<sup>-</sup>:*m/z* ber.: 565.3623, gef.: 565.3627.

**4-[(2*S*,3*R*,*E*)-2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-3-(methoxymethoxy)octadec-4-en-1-phosphoethylamino]-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 51**



**50** (0.220 g, 0.388 mmol, 1 eq.) wurde in MeOH (7.7 mL) gelöst und DIPEA (264 µL, 1.553 mmol, 4 eq.) addiert. NBDCl (0.232 g, 1.165 mmol, 3 eq.) wurde zugegeben und unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Nach 2.5 h wurden die flüchtigen Bestandteile im Luftstrom entfernt und der Rückstand in CHCl<sub>3</sub> (20 mL) aufgenommen. Die Lösung wurde mit zweimal 0.1 M aq. HCl (je 20 mL) gewaschen und mit wenig CHCl<sub>3</sub> reextrahiert. Die organische Phase wurde auf Celite adsorbiert und im Grobvakuum getrocknet. Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Me<sub>2</sub>CO:MeOH = 3:1:1 oder CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 100:15:1 → 40:10:1) lieferte die Titelverbindung in Form eines gelb-braunen Feststoffs (270 mg, 0.367 mmol, 95%).

*R<sub>f</sub>*(CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 100:15:1) = 0.11;

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD) δ = 8.45 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 6.19 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 5.75 – 5.60 (m, 1H, =CHCH<sub>2</sub>), 5.27 (dd, *J* = 15.2 Hz, 8.2, 1H, =CHCH), 4.63 (d, *J* = 6.4 Hz, 1H, OCHHO), 4.48 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, OCHHO), 4.22 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>O), 4.13 – 4.02 (m, 1H, CHO), 3.98 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>O), 3.87 (bs, 1H, CHNH), 3.68 (bs, 2H, CH<sub>2</sub>N), 3.57 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 2.01 (q, *J* = 6.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.38 (m, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.32 – 1.21 (m, 22H, 11x CH<sub>2</sub>), 0.88 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);

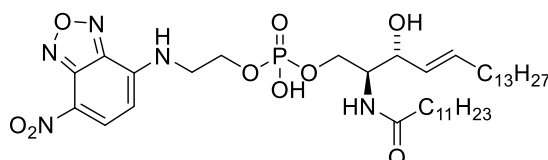
<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD) δ = 156.2 (NHCOO), 144.1 (C<sub>ar</sub>), 143.9 (C<sub>ar</sub>), 137.7 (=CHCH<sub>2</sub>), 137.2 (C<sub>ar</sub>), 136.7 (C<sub>ar</sub>), 125.2 (=CHCH), 122.8 (C<sub>ar</sub>), 98.2 (C<sub>ar</sub>), 93.5 (CH<sub>2</sub>OMe), 79.7 (CMe<sub>3</sub>), 76.4 (CHO), 64.5 (CH<sub>2</sub>OP), 62.5 (CH<sub>2</sub>OP), 55.4 (OCH<sub>3</sub>), 53.7 (CHNH), 44.5 (CH<sub>2</sub>N), 32.2 (CH<sub>2</sub>), 31.7 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 28.1 (C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 22.5 (CH<sub>2</sub>), 13.9 (CH<sub>3</sub>);

$^{31}\text{P}\{^1\text{H}\}$ -NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = -0.57$  (s, 1P);

HRMS (ESI):  $\text{C}_{33}\text{H}_{55}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{P}$   $[\text{M}-\text{H}]^-$ :

$m/z$  ber.: 728.3641, gef.: 728.3645.

**4-[(2*S*,3*R*,*E*)-2-(Dodecanoylamino)-3-hydroxyoctadec-4-en-1-phosphoethyl-amino]-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 0**



Unter Ar-Atmosphäre wurde **51** (0.062 g, 0.085 mmol, 1 eq.) in MeOH (8.5 mL) gelöst. Bei RT wurde 4 M HCl in 1,4-Dioxan (0.53 mL, 2.124 mmol, 25 eq.) zugetropft und die Reaktionsmischung anschließend bei 70°C für 3 h unter Lichtausschluss gerührt. Zu diesem Zeitpunkte zeigten HPLC-MS und DC vollständigen Eduktumsatz an. Die Reaktionsmischung wurde im Luftstrom eingengt und im Hochvakuum getrocknet. Der orangefarbene Rückstand wurde in tr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4.5 mL) und tr. DIPEA (0.116 mL, 0.680 mmol, 8 eq.) gelöst. **28**<sup>[150]</sup> (0.038 g, 0.127 mmol, 1.5 eq.) wurde in tr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 mL) gelöst und bei 0°C tropfenweise zur ersten Lösung gegeben. Anschließend rührte die Lösung über Nacht bei RT. Nachdem UPLC-MS und DC vollständigen Eduktumsatz anzeigten wurde die Reaktion durch Zugabe von MeOH (0.5 mL) beendet und für weitere 1 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (40 mL) verdünnt und zweimal mit 1 M aq. HCl (je 5 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtriert, eingengt und mittels Säulenchromatographie ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 100:15:1 \rightarrow 65:25:3$ ) aufgereinigt. Ein Drittel des so erhaltenen Materials einer präparativen DC ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 65:25:3$ ) unterworfen. Die Titelverbindung wurde als orangefarbener Feststoff (11.6 mg, 0.015 mmol, 18%) isoliert.

$R_f(\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 65:25:3) = 0.46$ ;

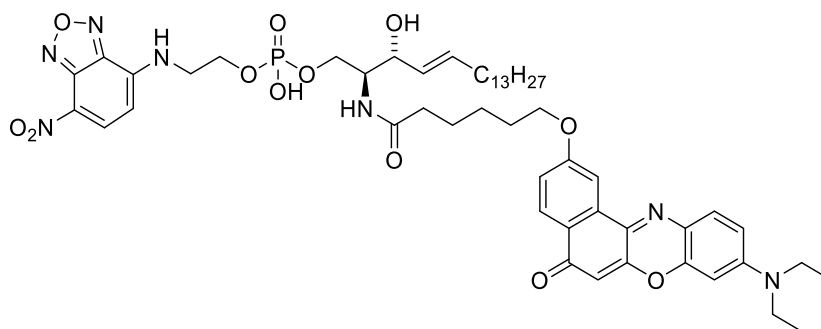
$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta = 8.30$  (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 6.93 (s, <1H,  $\text{H}_{\text{ex}}$ ), 5.97 (s, 1H,  $\text{CH}_{\text{ar}}$ ), 5.77 – 5.65 (m, 1H,  $=\text{CHCH}_2$ ), 5.43 (dd,  $J = 15.1, 7.2$  Hz, 1H,  $=\text{CHCH}$ ), 4.53 – 4.07 (m, 4H,  $\text{CH}_2\text{O}+2\times\text{CH}$ ), 4.04 (s, 1H, CH), 3.92 (s, 1H,  $\text{CHNH}$ ), 3.56 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.15 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.99 (q,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.66 – 1.43 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.42 – 1.07 (m, 38H, 19x  $\text{CH}_2$ ), 0.88 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 0.87 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C}$ -NMR (126 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 174.5 (CONH), 144.1 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 136.8 ( $\text{C}_{\text{ar}}$ ), 135.1 (=CH), 128.6 (=CH), 71.4 (CHO), 65.2 (d,  $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 62.6 ( $\text{CH}_2\text{OP}$ ), 53.8 (CHNH), 45.1 ( $\text{CH}_2\text{N}$ ), 36.7 ( $\text{CH}_2$ ), 32.5 ( $\text{CH}_2$ ), 32.0 ( $\text{CH}_2$ ), 29.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.8 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.7 ( $\text{CH}_2$ ), 29.6 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.5 ( $\text{CH}_2$ ), 29.4 ( $\text{CH}_2$ ), 25.9 ( $\text{CH}_2$ ), 22.7 ( $\text{CH}_2$ ), 14.1 ( $\text{CH}_3$ ), 14.1 ( $\text{CH}_3$ );

$^{31}\text{P}$ -NMR (202 MHz,  $\text{CDCl}_3+\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  = -3.13;

HRMS (ESI): $\text{C}_{38}\text{H}_{65}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ :	$m/z$ ber.: 766.4525, gef.: 766.4536,
$\text{C}_{38}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{O}_9\text{P}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ :	$m/z$ ber.: 768.4671, gef.: 768.4688.

**4-[(2*S*,3*R*,*E*)-2-(6-(9-Diethylamino-5-oxo-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-2-yloxy)-hexanoylamino)-3-hydroxyoctadec-4-en-1-phosphoethylamino]-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol **1****



Unter Ar-Atmosphäre wurde **51** (0.050 g, 0.068 mmol, 1 eq.) in MeOH (8.5 mL) und 3 Tropfen  $\text{CHCl}_3$  gelöst. Bei RT wurde 4 M HCl in 1,4-Dioxan (0.426 mL, 1.706 mmol, 25 eq.) zugegeben und die Reaktionsmischung 3 h bei 70°C unter Lichtausschluss gerührt. Zu diesem Zeitpunkte zeigten HPLC-MS und DC vollständigen Eduktumsatz an und die Reaktionsmischung wurde im Luftstrom eingeeengt. Nach Trocknung im Hochvakuum wurde der orangefarbene Rückstand in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3.4 mL) gelöst und DIPEA (46  $\mu\text{L}$ , 0.273 mmol, 4 eq.) addiert. Anschließend wurde **26** (0.056 g, 0.102 mmol, 1.5 eq.) in tr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL) gelöst und zur ersten Lösung getropft. Nach 20 h zeigten HPLC-MS und DC unvollständigen Umsatz des Intermediats an, worauf nochmals 4 eq. DIPEA und 1 eq. Aktivester in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 mL) zugegeben wurden. Nach weiteren 16 h wurde die Reaktionsmischung mit  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (30 mL) verdünnt, zweimal mit 0.02 M aq.  $\text{NaHSO}_4$  (je 30 mL) gewaschen und unter vermindertem Druck zur Trockne eingeeengt. Säulenchromatographie ( $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH}$  = 90:10:0  $\rightarrow$  80:20:1) und präparative DC



(CHCl<sub>3</sub>:MeOH:AcOH = 40:10:1) lieferten die Titelverbindung als violetten Feststoff (0.023 g, 0.023 mmol, 34%).

$R_f(\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 65:25:3) = 0.62$ ;

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 8.47 (d,  $J$  = 9.2 Hz, 1H, H<sub>ex</sub>), 8.39 (dd,  $J$  = 8.6, 3.7 Hz, 1H, CH<sub>ar,NBD</sub>), 8.15 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, CH<sub>ar,NR</sub>), 7.99 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H, CH<sub>ar,NR</sub>), 7.58 (dd,  $J$  = 9.1, 1.5 Hz, 1H, CH<sub>ar,NR</sub>), 7.15 (dd,  $J$  = 8.7, 2.5 Hz, 1H, CH<sub>ar,NR</sub>), 6.70 (dd,  $J$  = 9.2, 2.6 Hz, 1H, CH<sub>ar,NR</sub>), 6.47 (d,  $J$  = 2.5 Hz, 1H, CH<sub>ar,NR</sub>), 6.28 (s, 1H, CH<sub>ar,NR</sub>), 6.10 (s, 1H, CH<sub>ar,NBD</sub>), 5.70 (dt,  $J$  = 14.6, 6.8 Hz, 1H, =CHCH<sub>2</sub>), 5.43 (dd,  $J$  = 15.2, 7.3 Hz, 1H, =CHCHOH), 4.22 – 4.06 (m, 5H, CH<sub>2</sub>OC<sub>ar</sub>+CH<sub>2</sub>OP+CHOH), 4.03 (s, 1H, CHHOP), 3.68 – 3.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 3.50 (dd,  $J$  = 14.3, 7.1 Hz, 4H, 2x NCH<sub>2</sub>Me), 2.36 – 2.21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CON), 2.03 – 1.95 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.94 – 1.82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.78 – 1.67 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.56 (q,  $J$  = 7.4 Hz, 4H, 2x , CH<sub>2</sub>), 1.28 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 6H, 2x NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 1.26 – 1.16 (m, 20H, 20x CH<sub>2</sub>), 0.85 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>);

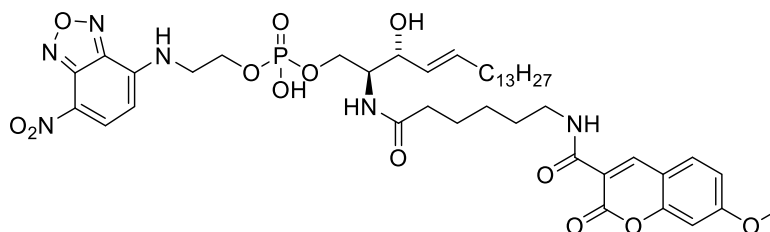
<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 161.7 (C<sub>ar</sub>OCH<sub>2</sub>), 155.1 (C<sub>ar</sub>N), 152.3 (C<sub>ar</sub>), 151.1 (C<sub>ar</sub>), 149.0 (C<sub>ar</sub>), 146.8 (C<sub>ar</sub>), 134.8 (C<sub>ar</sub>), 133.9 (=CHCH<sub>2</sub>), 130.9 (CH<sub>ar</sub>), 128.4 (=CHCH), 127.3 (CH<sub>ar</sub>), 124.8 (C<sub>ar</sub>), 124.7 (C<sub>ar</sub>), 118.0 (CH<sub>ar</sub>), 110.0 (CH<sub>ar</sub>), 106.1 (CH<sub>ar</sub>), 104.1 (CH<sub>ar</sub>), 95.8 (CH<sub>ar</sub>), 90.4 (CH<sub>ar</sub>), 67.9 (CH<sub>2</sub>OC<sub>ar</sub>), 60.5 (CH<sub>2</sub>), 44.9 (2x CH<sub>2</sub>N), 35.9 (CH<sub>2</sub>CO), 32.1 (CH<sub>2</sub>), 31.6 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 29.0 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 28.6 (CH<sub>2</sub>), 25.5 (CH<sub>2</sub>), 25.2 (CH<sub>2</sub>), 22.4 (CH<sub>2</sub>Me), 13.7 (CH<sub>3</sub>), 12.2 (2x NCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>);

<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 2.27 (s, 1P);

HRMS (ESI): C<sub>52</sub>H<sub>69</sub>N<sub>7</sub>O<sub>12</sub>P [M-H]<sup>-</sup>:

$m/z$  ber.: 1014.4747, gef.: 1014.4764.

**4-[(2*S*,3*R*,*E*)-2-(6-(7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-carboxamido)hexanoyl-amino)-3-hydroxyoctadec-4-en-1-phosphoethylamino]-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 2**



Unter Ar-Atmosphäre wurde **51** (0.029 g, 0.040 mmol, 1 eq.) in MeOH (4 mL) gelöst und mit 4 M HCl in 1,4-Dioxan (0.248 mL, 0.993 mmol, 25 eq.) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde 3 h bei 70°C unter Lichtausschluss gerührt. Zu diesem Zeitpunkte zeigten HPLC-MS und DC vollständigen Eduktumsatz. Die Reaktionsmischung wurde im Luftstrom eingeeengt und im Hochvakuum getrocknet. Der orangefarbene Rückstand wurde in tr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) gelöst und tr. DIPEA (0.054 mL, 0.318 mmol, 8 eq.) zugegeben. **27** (0.022 g, 0.052 mmol, 1.3 eq.) wurde ebenfalls in tr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 mL) gelöst und bei 0°C zur ersten Lösung getropft. Nach 22 h zeigten HPLC-MS und DC vollständigen Umsatz des Intermediats an. Die Reaktion wurde mit MeOH (0.5 mL) beendet und 1 h bei RT gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) verdünnt und zweimal mit 0.1 M aq. HCl (20 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtriert und eingeeengt. Säulenchromatographie (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 100:15:1 → 65:25:3) und anschließende präparative DC (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 100:15:1) lieferten die Titelverbindung als orangefarbenen Feststoff (28.7 mg, 0.0319 mmol, 80%).

$R_f(\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 65:25:3) = 0.63;$

$R_f(\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O} = 100:15:1) = 0.11;$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 8.87 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 1H, CONHCH<sub>2</sub>), 8.79 (s, 1H, CH<sub>ar,MCC</sub>), 8.42 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, CH<sub>ar,NBD</sub>), 7.61 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, CH<sub>ar,MCC</sub>), 6.94 (dd,  $J$  = 8.7, 2.3 Hz, 1H, CH<sub>ar,MCC</sub>), 6.85 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H, CH<sub>ar,MCC</sub>), 6.09 (s, 1H, CH<sub>ar,NBD</sub>), 5.70 (dt,  $J$  = 15.2, 6.6 Hz, 1H, =CHCH<sub>2</sub>), 5.44 (dd,  $J$  = 15.2, 7.0 Hz, 1H, =CHCHOH), 4.22 (s, 2H, CH<sub>2</sub>OP), 4.16 – 4.08 (m, 2H, CHOH+CHHOP), 4.04 (s, 1H, CHHOP), 3.92 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.65 (s, 1H, CHNH), 3.61 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OP), 2.42 (s, 1H, OH), 2.21 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.98 (q,  $J$  = 7.0 Hz,

2H, CH<sub>2</sub>), 1.85 (s, 1H, NH), 1.75 – 1.55 (m, 4H, CH<sub>2</sub>), 1.46 – 1.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.35 – 1.15 (m, 24H, CH<sub>2</sub>), 0.87 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>);

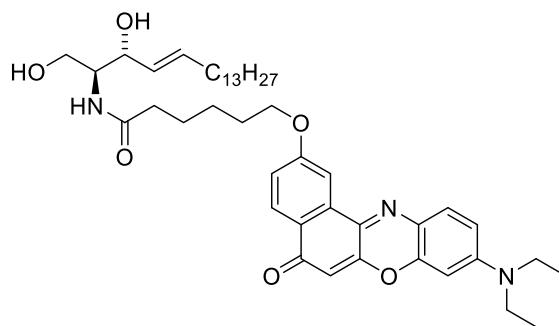
<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 165.1 (C<sub>ar</sub>OMe), 156.5 (CO), 148.5 (CH<sub>ar</sub>), 134.6 (=CHCH<sub>2</sub>), 131.1 (CH<sub>ar</sub>), 128.4 (=CHCH<sub>2</sub>), 114.2 (CH<sub>ar</sub>), 112.3 (CH<sub>ar</sub>), 100.2 (CH<sub>ar</sub>), 83.9 (CH<sub>ar</sub>), 71.6 (CHOH), 56.0 (CH<sub>3</sub>O), 39.4 (CH<sub>2</sub>NH), 36.1 (CH<sub>2</sub>CO), 32.4 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 28.9 (CH<sub>2</sub>), 26.3 (CH<sub>2</sub>), 25.1 (CH<sub>2</sub>), 22.6 (CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 14.0 (CH<sub>3</sub>);

<sup>31</sup>P{<sup>1</sup>H}-NMR (202 MHz, CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  = 2.25 (s, 1P);

HRMS (ESI): C <sub>43</sub> H <sub>60</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub> P [M-H] <sup>-</sup> :	$m/z$ ber.: 899.3961, gef.: 899.3975,
C <sub>43</sub> H <sub>59</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub> PNa [M-2H+Na] <sup>-</sup> :	$m/z$ ber.: 921.3781, gef.: 921.3796,
C <sub>43</sub> H <sub>62</sub> N <sub>6</sub> O <sub>13</sub> P [M+H] <sup>+</sup> :	$m/z$ ber.: 901.4107, gef.: 901.4105.

## 6-8-6 | Ceramide

### 6-[9-(Diethylamino)-5-oxo-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-2-yloxy]-*N*-[(2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl]hexanamid (NR-Cer) 4



**41** (0.089 g, 0.139 mmol, 1 eq.) wurde in MeOH (16 mL) gelöst und 4 M HCl in 1,4-Dioxan (870  $\mu$ L, 3.487 mmol, 25 eq.) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung rührte 6 h bei 80°C und wurde anschließend unter vermindertem Druck eingengt. Der Rückstand wurde in CHCl<sub>3</sub> und 1 M aq. HCl (je 20 mL) aufgenommen und die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde mit ges. aq. NaHCO<sub>3</sub> (50 mL) basifiziert und zweimal mit CHCl<sub>3</sub> (je 20 mL) extrahiert. Durch Einengen der vereinigten organischen Extrakte wurde Sphingosin **54** im Gemisch mit Resten der abgespaltenen Schutzgruppe erhalten ( $R_f$ (CHCl<sub>3</sub>:MeOH:H<sub>2</sub>O = 65:25:3) = 0.8).

Dieses Rohmaterial wurde ohne weitere Aufreinigung direkt weiterverwendet. 85% des Roh-Sphingosins **54** (~115 mmol, 1 eq.) wurden in tr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1.3 mL) gelöst und DIPEA (78 µL, 0.458 mmol, 4 eq.) addiert. Eine Lösung von **26** (0.075 g, 0.137 mmol, 1.2 eq.) in tr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) wurde tropfenweise zugegeben. Unter Lichtausschluss rührte die Reaktion 21 h, bevor 0.1 M aq. HCl (15 mL) zugegeben und die Mischung mit EA (20 mL) extrahiert wurde. Die organische Phase wurde mit H<sub>2</sub>O (10 mL) gewaschen, Celite zugegeben und alle flüchtigen Bestandteile am Rotationsverdampfer entfernt. Durch wiederholte Säulenchromatographie (EA:MeOH = 1:0→98:2 und anschließend EA:MeOH:AcOH = 99.4:0.5:0.1→97.9:2:0.1) wurde die Titelverbindung als dunkelvioletter Feststoff (0.054 g, 0.074 mmol, 63% über zwei Schritte) isoliert.

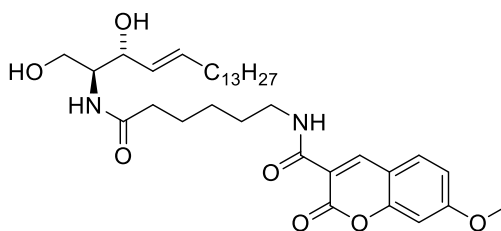
$R_f(\text{EA:MeOH}=98:2) = 0.45;$

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 8.07 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 7.87 (d,  $J$  = 2.1 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 7.56 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 7.02 (dd,  $J$  = 8.7, 2.1 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 6.79 (d,  $J$  = 6.8 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 6.71 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 6.46 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 6.41 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 5.83 – 5.72 (m, 1H, =CHCH<sub>2</sub>), 5.54 (dd,  $J$  = 15.4, 6.1 Hz, 1H, =CHCH), 4.42 – 4.30 (m, 1H, CHOH), 4.10 (t,  $J$  = 6.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH=), 4.04 – 3.97 (m, 1H, CHHOH), 3.97 – 3.93 (m, 1H, CHNH), 3.75 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H, CHHOH), 3.49 (q,  $J$  = 6.8 Hz, 4H, N(CH<sub>2</sub>Me)<sub>2</sub>), 2.96 (bs, 3H, 3x H<sub>ex</sub>), 2.35 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.03 (d,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.87 (p,  $J$  = 7.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.80 (p,  $J$  = 7.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.66 – 1.51 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.39 – 1.31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.28 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 6H, 2x CH<sub>3</sub>), 1.22 (s, 22H, 11x CH<sub>2</sub>), 0.87 (t,  $J$  = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>);

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 182.0 (CO), 173.8 (CONH), 173.7 (C<sub>ar</sub>OC), 161.7 (C<sub>ar</sub>), 151.9 (C<sub>ar</sub>), 151.2 (C<sub>ar</sub>), 146.9 (C<sub>ar</sub>), 138.7 (C<sub>ar</sub>), 133.9 (C<sub>ar</sub>), 133.8 (=CHCH<sub>2</sub>), 131.4 (C<sub>ar</sub>H), 128.9 (=CHCH), 127.4 (C<sub>ar</sub>H), 125.7 (C<sub>ar</sub>), 124.6 (C<sub>ar</sub>), 118.2 (C<sub>ar</sub>H), 110.6 (C<sub>ar</sub>H), 106.3 (C<sub>ar</sub>H), 104.2 (C<sub>ar</sub>H), 96.2 (C<sub>ar</sub>H), 74.5 (CHOH), 68.1 (CH<sub>2</sub>OC<sub>ar</sub>), 62.3 (CH<sub>2</sub>OH), 54.7 (CHNH), 45.4 (2x NCH<sub>2</sub>Me), 36.6 (CH<sub>2</sub>CONH), 32.3 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 28.8 (CH<sub>2</sub>), 25.7 (CH<sub>2</sub>), 25.5 (CH<sub>2</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>Me), 14.1 (CH<sub>3</sub>), 12.6 (2x NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>);

HRMS(ESI):	C <sub>44</sub> H <sub>64</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> [M+H] <sup>+</sup> :	$m/z$ ber.: 730.4790, gef.: 730.4805,
	C <sub>44</sub> H <sub>63</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> Na [M+Na] <sup>+</sup> :	$m/z$ ber.: 752.4633, gef.: 752.4636.

***N*-{6-[(2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-ylamino]-6-oxohexyl}-7-methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-carboxamid (MCC-Cer) 5**



**53** (0.043 g, 0.097 mmol, 1 eq.) wurde in MeOH (10 mL) gelöst und 4 M HCl in 1,4-Dioxan (606 µL, 2.423 mmol, 25 eq.) tropfenweise zugegeben. Die Reaktionsmischung rührte 100 min bei 70°C und wurde anschließend im Luftstrom eingengt und unter vermindertem Druck getrocknet. Der Rückstand wurde in tr. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL) gelöst und tr. DIPEA (0.132 mL, 0.775 mmol, 8 eq.) addiert. Bei 0°C wurde eine Lösung von **27** (0.050 mg, 0.116 mmol, 1.2 eq.) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL) tropfenweise zugegeben. Unter Lichtausschluss rührte die Reaktion 20 h, bevor der verbliebene Aktivester durch Zugabe von MeOH (1 mL) und erneutes Rühren für 1 h abreagiert wurde. Es wurde mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) verdünnt und das Gemisch mit 0.5 M KHSO<sub>4</sub> (40 mL) gewaschen. Die organische Phase wurde abgetrennt, getrocknet (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtriert und im Vakuum eingengt. Nach Säulenchromatographie (EA:MeOH = 100:0→95:5) wurde die Titelverbindung in Form eines farblosen Feststoffes (0.050 g, 0.082 mmol, 85% über zwei Schritte) erhalten.

$R_f(\text{EA:MeOH:AcOH} = 94:5:1) = 0.15;$

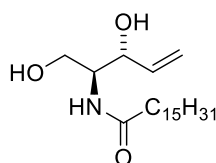
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 8.88 (t,  $J$  = 5.7 Hz, 1H, NHCH<sub>2</sub>), 8.78 (s, 1H, CH<sub>ar</sub>), 7.58 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 6.94 (dd,  $J$  = 8.7, 2.3 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 6.86 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H, CH<sub>ar</sub>), 6.51 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 1H, NHCH), 5.84 – 5.73 (m, 1H, =CHCH<sub>2</sub>), 5.52 (dd,  $J$  = 15.5, 5.9 Hz, 1H, =CHCH), 4.30 (s, 1H, CHOH), 3.98 (dd,  $J$  = 11.5, 2.4 Hz, 1H, CHHOH), 3.91 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>), 3.91 – 3.86 (m, 1H, CHNH), 3.79 (s, 1H, OH), 3.68 (d,  $J$  = 11.0 Hz, 1H, CHHOH), 3.44 (pd+s,  $J$  = 13.0, 6.4 Hz, 2H+1H, CH<sub>2</sub>NH+OH), 2.26 (td,  $J$  = 7.0, 1.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CONH), 2.02 (q,  $J$  = 6.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.72 (dt,  $J$  = 14.6, 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.68 – 1.58 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.49 – 1.38 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.38 – 1.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.31 – 1.19 (m, 20H, 10x CH<sub>2</sub>), 0.87 (t,  $J$  = 6.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>);

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 173.3 (CONHCH), 164.9 (C<sub>ar</sub>OMe), 162.4 (CONHCH<sub>2</sub>), 161.9 (CO<sub>2</sub>), 156.6 (C<sub>ar</sub>OCO), 148.4 (CH<sub>ar</sub>), 133.5 (=CHCH<sub>2</sub>), 131.0 (CH<sub>ar</sub>), 129.1 (=CHCH), 114.5 (C<sub>ar</sub>), 114.1 (CH<sub>ar</sub>), 112.4 (C<sub>ar</sub>CONH), 100.3 (CH<sub>ar</sub>), 74.6 (CHOH), 62.3 (CH<sub>2</sub>OH), 56.0

(OCH<sub>3</sub>), 54.0 (CHNH), 39.6 (CH<sub>2</sub>NH), 36.6 (CH<sub>2</sub>CONH), 32.3 (CH<sub>2</sub>CH=), 31.9 (CH<sub>2</sub>Et), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 26.4 (CH<sub>2</sub>), 25.3 (CH<sub>2</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>Me), 14.1 (CH<sub>3</sub>);

HRMS(ESI): C<sub>35</sub>H<sub>55</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [M+H]<sup>+</sup>:  $m/z$  ber.: 615.4004, gef.: 615.4061,  
C<sub>35</sub>H<sub>54</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>Na [M+Na]<sup>+</sup>:  $m/z$  ber.: 637.3823, gef.: 637.3895.

### ***N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihydroxypent-4-en-2-yl)palmitamid 56**



(*S*)-*tert*-Butyl-4-((*R*)-1-hydroxyallyl)-2,2-dimethyloxazolidin-3-carboxylat **34** (0.433 g, 1.680 mmol, 1 eq.) wurde in 1,4-Dioxan (0.5 mL) gelöst. Bei 0°C wurde 4 M HCl in 1,4-Dioxan (9.2 mL) tropfenweise addiert. Es wurde für 2 h bei RT gerührt, H<sub>2</sub>O (0.5 mL) zugegeben und nochmals für 1 h gerührt. Die flüchtigen Bestandteile wurden unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in H<sub>2</sub>O (2 mL) und Eisessig (4 mL) aufgenommen. Es wurde für 2 h bei RT gerührt und anschließend unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde in 1 M aq. NaHCO<sub>3</sub> (2 mL) gelöst, 10 min bei RT gerührt und der pH-Wert geprüft (8.5). Zu dieser gepufferten Lösung wurde eine Lösung von Palmitinsäure-*N*-succinimidylester **29** (0.685 g, 1.938 mmol, 1.15 eq.) in 1,4-Dioxan (2.5 mL) bei RT tropfenweise zugegeben. Es wurde 24 h bei RT gerührt und der pH-Wert durch Zugabe von 1 M aq. NaHCO<sub>3</sub>:1,4-Dioxan = 1:1 konstant gehalten. Nachdem MS unvollständigen Umsatz zeigte, wurden nochmals Palmitinsäure-*N*-succinimidylester (0.080 g, 0.226 mmol, 0.1 eq.) und 1 M aq. NaHCO<sub>3</sub> (4 mL) zugegeben und 3 h bei RT gerührt. Anschließend wurde die Reaktionsmischung mit ges. aq. NaHCO<sub>3</sub> (35 mL) verdünnt und mit CHCl<sub>3</sub> (3x 35 mL) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit 1 M aq. HCl (25 mL) und ges. aq. NaCl (25 mL) gewaschen, filtriert und unter vermindertem Druck eingeeengt. Säulenchromatographie (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 96:4) ergab die Titelverbindung als farblosen Feststoff (0.235 g, 0.661 mmol, 39%).

$R_f$  (CHCl<sub>3</sub>:MeOH = 9:1) = 0.39;

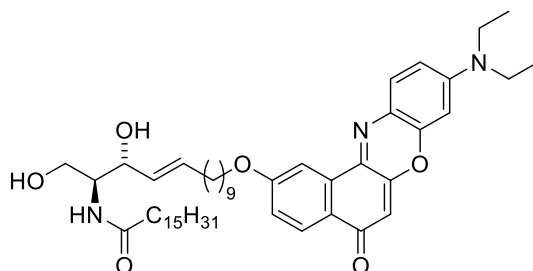
$\alpha$ (D, MeOH, RT,  $c = 1$ ) = -4.6°;

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 5.89 (ddd, 1H,  $J$  = 17.0, 10.4, 6.4 Hz, =CH), 5.29 (dt, 1H,  $J$  = 17.1, 1.5 Hz, =CHH), 5.15 (dt, 1H,  $J$  = 10.6, 1.5 Hz, =CHH), 4.13 (tt, 1H,  $J$  = 6.6, 1.1 Hz, CHOH), 3.90 (m, 2H, CHHOH), 3.69 (m, 1H, CHHOH), 2.21 (t, 2H,  $J$  = 7.6 Hz,  $\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 1.60 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.22-1.38 (m, 24H,  $\text{CH}_2$ ), 0.90 (t, 3H,  $J$  = 7.0 Hz,  $\text{CH}_3$ );

$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  = 176.5 (CON), 139.6 (=CH), 116.8 (=CH<sub>2</sub>), 73.9 (CHOH), 62.1 ( $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 56.6 (CHNH), 37.3 ( $\text{CH}_2\text{CONH}$ ), 33.1 ( $\text{CH}_2$ ), 30.8 ( $\text{CH}_2$ ), 30.8 ( $\text{CH}_2$ ), 30.8 ( $\text{CH}_2$ ), 30.7 ( $\text{CH}_2$ ), 30.5 ( $\text{CH}_2$ ), 30.5 ( $\text{CH}_2$ ), 30.4 ( $\text{CH}_2$ ), 27.1 ( $\text{CH}_2$ ), 23.8 ( $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 14.5 ( $\text{CH}_3$ );

HRMS(ESI):  $\text{C}_{21}\text{H}_{41}\text{NO}_3\text{Na}$   $[\text{M}+\text{Na}]^+$ :  $m/z$  ber.: 378.2979, gef.: 378.2980.

**2-((2*S*,3*R*,4*E*)-1,3-Dihydroxy-2-*N*-palmitamidotetradec-4-en-14-yloxy)-9-diethylamino-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-5-on 7**



Die Olefine 2-(Undec-10-enyloxy)-9-(diethylamino)-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-5-on<sup>[119]</sup> (0.202 g, 0.416 mmol, 4 eq.) und **56** (0.037 g, 0.104 mmol, 1eq.) wurden unter einer Ar-Atmosphäre in tr.  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mL) gelöst. GRUBBS-Katalysator der zweiten Generation (2 mg, 0.002 mmol, 0.05 eq.) wurde bei RT zugegeben. Unter Lichtausschluss wurde die Mischung unter Rückfluss zum Sieden erhitzt bis DC ( $\text{CHCl}_3\text{:MeOH}$  = 20:1) nach etwa 2 h den vollständigen Umsatz des Edukts anzeigte. Im Anschluss wurde Celite addiert und die flüchtigen Bestandteile unter vermindertem Druck entfernt. Säulenchromatographie ( $\text{MeOH:EA:CH}$  = 0:6:4  $\rightarrow$  0:0:1  $\rightarrow$  1:0:99  $\rightarrow$  6:0:94) lieferte die Titelverbindung in Form eines violetten Feststoffs (56.6 mg, 0.070 mmol, 67%).

$R_f$  (EA:CH = 3:2) = 0.13;

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  = 8.17 (d, 1H,  $J$  = 8.7 Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 8.01 (s, 1H,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.58 (d, 1H,  $J$  = 9.0 Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 7.13 (d, 1H,  $J$  = 8.7 Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.67 (d, 1H,  $J$  = 8.9 Hz,  $\text{H}_{\text{ar}}$ ), 6.54 (d, 1H,  $J$  = 6.4 Hz,

NH), 6.44 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 6.32 (s, 1H, H<sub>ar</sub>), 5.76 (m, 1H, CHCH), 5.52 (dd, 1H,  $J = 15.4, 6.4$  Hz, CHCH), 4.31 (bt, 1H,  $J = 4.9$  Hz, CHOH), 4.14 (t, 2H,  $J = 6.3$  Hz, CH<sub>2</sub>O), 3.97 (dd, 1H,  $J = 11.2, 3.9$  Hz, CHH), 3.91 (td, 1H,  $J = 11.4, 3.7$  Hz, CHH), 3.70 (dd, 1H,  $J = 11.1, 3.1$  Hz, CHN), 3.46 (q, 4H,  $J = 6.8$  Hz, NCH<sub>2</sub>), 3.21 (bs, 2H, OH), 2.22 (t, 2H,  $J = 7.7$  Hz, CH<sub>2</sub>CON), 2.02 (dd, 2H,  $J = 14.1, 6.9$  Hz, CH<sub>2</sub>), 1.84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.61 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.49 (dd, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.38-1.23 (m, 42H, CH<sub>2</sub> + 2x CH<sub>3</sub>), 0.86 (t, 3H,  $J = 7.0$  Hz, CH<sub>3</sub>);

<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  = 182.9 (CO), 181.3 (CO), 174.0 (C<sub>ar</sub>), 161.9 (C<sub>ar</sub>), 152.0 (C<sub>ar</sub>), 150.9 (C<sub>ar</sub>), 146.9 (C<sub>ar</sub>), 139.4 (C<sub>ar</sub>), 134.0 (C<sub>ar</sub>), 133.8 (CH<sub>ar</sub>), 131.2 (CH), 129.0 (CH), 127.6 (CH<sub>ar</sub>), 125.0 (C<sub>ar</sub>), 118.3 (CH<sub>ar</sub>), 110.1 (CH<sub>ar</sub>), 106.6 (CH<sub>ar</sub>), 104.7 (CH<sub>ar</sub>), 96.3 (CH<sub>ar</sub>), 74.4 (CHOH), 68.3 (CH<sub>2</sub>O), 62.4 (CH<sub>2</sub>OH), 54.7 (CHNH), 45.2 (NCH<sub>2</sub>), 36.8 (CH<sub>2</sub>CON), 32.3 (CH<sub>2</sub>), 31.9 (CH<sub>2</sub>), 29.7 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.6 (CH<sub>2</sub>), 29.5 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.4 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.3 (CH<sub>2</sub>), 29.2 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 29.1 (CH<sub>2</sub>), 25.9 (CH<sub>2</sub>), 25.8 (CH<sub>2</sub>), 25.7 (CH<sub>2</sub>), 22.7 (CH<sub>2</sub>), 14.1 (CH<sub>3</sub>), 12.6 (CH<sub>3</sub>);

HRMS (ESI): C <sub>50</sub> H <sub>76</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> [M+H] <sup>+</sup> :	$m/z$ ber.: 814.5732, gef.: 814.5729,
C <sub>50</sub> H <sub>75</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> Na [M+Na] <sup>+</sup> :	$m/z$ ber.: 836.5548, gef.: 836.5552.



## 7 | Literatur

- [1] J. L. W. Thudichum, *Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere*, Verlag Franz Pietzcker, Tübingen, **1901**.
- [2] J. Wilson, T. Hunt, *Molecular Biology of the Cell*, Garland Science, New York, **2002**.
- [3] H. R. Horton, L. A. Moran, K. G. Scrimgeour, M. D. Perry, J. D. Rawn, C. Biele, *Biochemie*, Pearson Studium, München, **2008**.
- [4] T. Kolter, K. Sandhoff, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1532–1568, *Angew. Chem.* **1999**, *111*, 1632–1670.
- [5] A. C. Correa, C. Schultz, in *BT - Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.* (Ed.: T.W.J. Gadella), Elsevier, **2009**, pp. 225–288.
- [6] J. L. W. Thudichum, *A Treatise on the Chemical Constitution of the Brain*, Bailliere, Tindall, And Cox, London, **1884**.
- [7] T. Kolter, *RÖMPP Online* **2007**, Sphingomyelin.
- [8] T. Kolter, K. Sandhoff, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2005**, *21*, 81–103.
- [9] B. Otterbach, W. Stoffel, *Cell* **1995**, *81*, 1053–1061.
- [10] M. Amaro, R. Šachl, G. Aydogan, I. I. Mikhalyov, R. Vácha, M. Hof, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, *55*, 9411–9415, *Angew. Chem.* **2016**, *128*, 9557–9562.
- [11] Y. A. Hannun, R. M. Bell, *Science* **1989**, *243*, 500–507.
- [12] F. M. Goñi, L.-R. Montes, A. Alonso, *Prog. Lipid Res.* **2012**, *51*, 238–266.
- [13] D. Newrzella, W. Stoffel, *Biol. Chem. Hoppe. Seyler* **1992**, *373*, 1233–1238.
- [14] M. Kölzer, C. Arenz, K. Ferlinz, N. Werth, H. Schulze, R. Klingenstein, K. Sandhoff, *Biol. Chem.* **2003**, *384*, 1293–1298.
- [15] A. G. Roth, S. Redmer, C. Arenz, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2367–2374.
- [16] T. Pinkert, Synthese neuer Inhibitoren der sauren Sphingomyelinase, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, **2011**.
- [17] S. L. Schissel, E. H. Schuchman, K. J. Williams, I. Tabas, *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 18431–18436.
- [18] A. G. Roth, D. Drescher, Y. Yang, S. Redmer, S. Uhlig, C. Arenz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 7560–7563, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 7697–7700.
- [19] R. Göggel, S. Winoto-Morbach, G. Vielhaber, Y. Imai, K. Lindner, L. Brade, H. Brade, S. Ehlers, A. S. Slutsky, S. Schütze, et al., *Nat. Med.* **2004**, *10*, 155–160.
- [20] M. Zumbansen, W. Stoffel, *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 3633–3638.
- [21] S. Tomiuk, K. Hofmann, M. Nix, M. Zumbansen, W. Stoffel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1998**, *95*, 3638–3643.
- [22] C. Arenz, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2000**, *39*, 1440–1442, *Angew. Chem.* **2000**, *112*, 1498–1500.
- [23] O. Krut, K. Wiegmann, H. Kashkar, B. Yazdanpanah, M. Krönke, *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 13784–13793.
- [24] Å. Nilsson, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1969**, *176*, 339–347.
- [25] S. L. Schissel, X. Jiang, J. Tweedie-Hardman, T. Jeong, E. H. Camejo, J. Najib, J. H. Rapp, K. J. Williams, I. Tabas, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 2738–2746.
- [26] S. L. Schissel, G. A. Keesler, E. H. Schuchman, K. J. Williams, I. Tabas, *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 18250–18259.
- [27] J. A. Rotolo, J. Zhang, M. Donepudi, H. Lee, Z. Fuks, R. Kolesnick, *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26425–26434.
- [28] N. Beckmann, D. Sharma, E. Gulbins, K. A. Becker, B. Edelmann, *Front. Physiol.* **2014**, *5*, Article 331.

- [29] Y. Zhang, P. Mattjus, P. C. Schmid, Z. Dong, S. Zhong, W.-Y. Ma, R. E. Brown, A. M. Bode, H. H. O. Schmid, Z. Dong, *J. Biol. Chem.* **2001**, 276, 11775–11782.
- [30] L. M. Obeid, C. M. Linardic, L. A. Karolak, Y. A. Hannun, *Science* **1993**, 259, 1769–1771.
- [31] J. N. Hawthorne, G. B. Ansell, *Phospholipids*, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, **1982**.
- [32] D. Graber, R. Salvayre, T. Levade, *J. Neurochem.* **1994**, 63, 1060–1068.
- [33] T. Kolter, *RÖMPP Online* **2012**, Niemann-Pick-Krankheit.
- [34] “Genzyme Presents Data from its Phase 1b Program for Niemann-Pick Type B at the Lysosomal Disease Network’s WORLD Symposium 2015,”  
Quelle: <http://news.genzyme.com/press-release/>, **2015**.
- [35] S. Ficht-Redmer, Expression, Reinigung und biophysikalische Charakterisierung verschiedener Hydrolasen des Sphingolipid-Stoffwechsels, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, **2013**.
- [36] L. E. Quintern, T. S. Zenk, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta* **1989**, 1003, 121–124.
- [37] V. Teichgräber, M. Ulrich, N. Endlich, J. Riethmüller, B. Wilker, C. C. D. Oliveira-Munding, A. M. van Heeckeren, M. L. Barr, G. von Kürthy, K. W. Schmid, et al., *Nat. Med.* **2008**, 14, 382–391.
- [38] K. A. Becker, J. Riethmüller, A. Luth, G. Döring, B. Kleuser, E. Gulbins, *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **2010**, 42, 716–724.
- [39] H. Peng, C. Li, S. Kadow, B. D. Henry, J. Steinmann, K. A. Becker, A. Riehle, N. Beckmann, B. Wilker, P.-L. Li, et al., *J. Mol. Med. Berl. Ger.* **2015**, 93, 675–689.
- [40] J. Sosna, S. Philipp, J. F. Chico, C. Saggau, J. Fritsch, A. Föll, J. Plenge, C. Arenz, T. Pinkert, H. Kalthoff, et al., *Mol. Cell. Biol.* **2016**, 36, 2626–2644.
- [41] J. Jacobi, M. García-Barros, S. Rao, J. A. Rotolo, C. Thompson, A. Mizrahi, R. Feldman, K. Manova, A. Bielawska, J. Bielawska, et al., *Cell. Signal.* **2017**, 29, 52–61.
- [42] F. Paris, Z. Fuks, A. Kang, P. Capodici, G. Juan, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo, R. Kolesnick, *Science* **2001**, 293, 293–297.
- [43] G. Grammatikos, V. Teichgräber, A. Carpinteiro, T. Trarbach, M. Weller, U. R. Hengge, E. Gulbins, *Antioxid. Redox Signal.* **2007**, 9, 1449–1456.
- [44] R. Savić, E. H. Schuchman, *Adv. Cancer Res.* **2013**, 117, 91–115.
- [45] A. Carpinteiro, K. A. Becker, L. Japtok, G. Hessler, S. Keitsch, M. Požgajová, K. W. Schmid, C. Adams, S. Müller, B. Kleuser, et al., *EMBO Mol. Med.* **2015**, 7, 714–734.
- [46] J. Kornhuber, P. Tripal, M. Reichel, C. Mühle, C. Rhein, M. Muehlbacher, T. W. Groemer, E. Gulbins, *Cell. Physiol. Biochem.* **2010**, 26, 9–20.
- [47] N. H. T. Petersen, O. D. Olsen, L. Groth-Pedersen, A.-M. Ellegaard, M. Bilgin, S. Redmer, M. S. Ostfeld, D. Ulanet, T. H. Dovmark, A. Lønborg, et al., *Cancer Cell* **2013**, 24, 379–393.
- [48] E. Gulbins, M. Palmada, M. Reichel, A. Lüth, C. Böhmer, D. Amato, C. P. Müller, C. H. Tischbirek, T. W. Groemer, G. Tabatabai, et al., *Nat. Med.* **2013**, 19, 934–938.
- [49] A. Gorelik, K. Illes, L. X. Heinz, G. Superti-Furga, B. Nagar, *Nat. Commun.* **2016**, 7, 12196.
- [50] A. L. Lehninger, D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman, New York, **2005**.
- [51] F. Lottspeich, J. W. Engels, *Bioanalytik*, Springer Spektrum, Berlin Heidelberg, **2012**.
- [52] G. S. Sittampalam, N. P. Coussens, K. Brimacombe, A. Grossman, M. Arkin, D. Auld, C. Austin, B. Bejcek, M. Glicksman, J. Inglese, et al., Eds., *Assay Guidance Manual*, Eli

- Lilly & Company And The National Center For Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD), **2004**.
- [53] I. Nieves, P. Sanllehí, J. L. Abad, G. Fabriàs, J. Casas, A. Delgado, in *Bioact. Sphingolipids Cancer Biol. Ther.* (Eds.: Y.A. Hannun, C. Luberto, C. Mao, L.M. Obeid), Springer International Publishing, Cham, **2015**, pp. 437–469.
- [54] S. J. Thannhauser, M. Reichel, *J. Biol. Chem.* **1940**, *135*, 1–13.
- [55] J. N. Kanfer, O. M. Young, D. Shapiro, R. O. Brady, *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 1081–1084.
- [56] R. J. Mintzer, K. C. Appell, A. Cole, A. Johns, R. Pagila, M. A. Polokoff, I. Tabas, R. M. Snider, J. A. Meurer-Ogden, *J. Biomol. Screen.* **2005**, *10*, 225–234.
- [57] K. Sandhoff, K. Harzer, W. Wässle, H. Jatzkewitz, *J. Neurochem.* **1971**, *18*, 2469–2489.
- [58] K. Harzer, H. U. Benz, *J. Neurochem.* **1973**, *21*, 999–1001.
- [59] A. Loidl, R. Claus, H. P. Deigner, A. Hermetter, *J. Lipid Res.* **2002**, *43*, 815–823.
- [60] D. J. López, M. Egidio-Gabas, I. López-Montero, J. V. Busto, J. Casas, M. Garnier, F. Monroy, B. Larijani, F. M. Goñi, A. Alonso, *Biophys. J.* **2012**, *102*, 2077–2085.
- [61] W.-L. Chuang, J. Pacheco, S. Cooper, J. S. Kingsbury, J. Hinds, P. Wolf, P. Oliva, J. Keutzer, G. F. Cox, K. Zhang, *Mol. Genet. Metab. Rep.* **2015**, *3*, 55–57.
- [62] A. E. Gal, F. J. Fash, *Chem. Phys. Lipids* **1976**, *16*, 71–79.
- [63] A. E. Gal, R. O. Brady, S. R. Hibbert, P. G. Pentchev, *N. Engl. J. Med.* **1975**, *293*, 632–636.
- [64] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, New York, **2010**.
- [65] O. P. van Diggelen, Y. V. Voznyi, J. L. M. Keulemans, K. Schoonderwoerd, J. Ledvinova, E. Mengel, M. Zschiesche, R. Santer, K. Harzer, *J. Inherit. Metab. Dis.* **2005**, *28*, 733–741.
- [66] M. Zhou, Z. Diwu, N. Panchuk-Voloshina, R. P. Haugland, *Anal. Biochem.* **1997**, *253*, 162–168.
- [67] J. J. Gaudino, K. Bjergarde, P.-Y. Chan-Hui, C. D. Wright, D. S. Thomson, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1127–1132.
- [68] J. Hartmann-Schreiner, *RÖMPP Online* **2004**, Sphingosin.
- [69] H. Schulze, C. Michel, G. van Echten-Deckert, in *Methods Enzymol.* (Eds.: A.H. Merrill, Y.A. Hannun), Academic Press, **2000**, pp. 22–30.
- [70] T. Linke, G. Wilkening, S. Lansmann, H. Moczall, O. Bartelsen, J. Weisgerber, K. Sandhoff, *Biol. Chem.* **2001**, *382*, 283–290.
- [71] T. Taketomi, N. Kawamura, *J. Biochem. (Tokyo)* **1972**, *72*, 189–193.
- [72] H. V. Overloop, G. V. der Hoeven, P. P. V. Veldhoven, *J. Lipid Res.* **2005**, *46*, 812–816.
- [73] P. M. Koskinen, A. M. P. Koskinen, in *Methods Enzymol.* (Eds.: A.H. Merrill, Y.A. Hannun), Academic Press, **2000**, pp. 458–479.
- [74] M. Kiso, A. Nakamura, J. Nakamura, Y. Tomita, A. Hasegawa, *J. Carbohydr. Chem.* **1986**, *5*, 335–340.
- [75] P. Garner, J. M. Park, E. Malecki, *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 4395–4398.
- [76] T. Yamamoto, H. Hasegawa, T. Hakogi, S. Katsumura, *Org. Lett.* **2006**, *8*, 5569–5572.
- [77] P. Garner, J. M. Park, *J. Org. Chem.* **1987**, *52*, 2361–2364.
- [78] S. T. Nguyen, L. K. Johnson, R. H. Grubbs, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 3974–3975.
- [79] P. Nussbaumer, P. Ettmayer, C. Peters, D. Rosenbeiger, K. Högenauer, *Chem. Commun.* **2005**, 5086–5087.
- [80] A. El-Dahshan, S. I. Al-Gharabli, S. Radetzki, T. H. Al-Tel, P. Kumar, J. Rademann, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 5506–5512.

- [81] A. Gómez-Muñoz, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2006**, 1758, 2049–2056.
- [82] N. C. Hait, C. A. Oskeritzian, S. W. Paugh, S. Milstien, S. Spiegel, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **2006**, 1758, 2016–2026.
- [83] T. Kolter, *RÖMPP Online* **2007**, Phospholipide.
- [84] IUPAC Commission on Biochemical Nomenclature, *Eur. J. Biochem.* **1977**, 79, 11–21.
- [85] C. B. Reese, *Org. Biomol. Chem.* **2005**, 3, 3851–3868.
- [86] A. F. Stepanov, V. I. Shvets, *Chem. Phys. Lipids* **1986**, 41, 1–51.
- [87] M. C. Hewitt, D. A. Snyder, P. H. Seeberger, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 13434–13436.
- [88] N. G. Dolinnaya, N. I. Sokolova, D. T. Ashirbekova, Z. A. Shabarova, *Nucleic Acids Res.* **1991**, 19, 3067–3072.
- [89] H. Eibl, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1978**, 75, 4074–4077.
- [90] R. Hirt, R. Berchtold, *Helv. Chim. Acta* **1957**, 40, 1928–1932.
- [91] I. Lindh, J. Stawinski, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 1338–1342.
- [92] S. L. Beaucage, M. H. Caruthers, *Tetrahedron Lett.* **1981**, 22, 1859–1862.
- [93] M. H. Caruthers, *Science* **1985**, 230, 281–285.
- [94] *RÖMPP Online* **2002**, Fluorit.
- [95] S. W. Hell, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, 54, 8054–8066, *Angew. Chem.* **2015**, 127, 8167–8181.
- [96] A. P. Demchenko, *Introduction to Fluorescence Sensing*, Springer International Publishing, Cham, **2015**.
- [97] W. Rettig, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1986**, 25, 971–988, *Angew. Chem.* **1986**, 98, 969–986.
- [98] R. M. Clegg, in *BT - Lab. Tech. Biochem. Mol. Biol.* (Ed.: T.W.J. Gadella), Elsevier, **2009**, pp. 1–57.
- [99] R. G. W. Norrish, F. W. Kirkbride, *J. Chem. Soc.* **1932**, 1518–1530.
- [100] T. Laue, A. Plagens, *Namen- und Schlagwort-Reaktionen der organischen Chemie*, Teubner, Wiesbaden, **2006**.
- [101] S. Haldar, A. Chattopadhyay, in *Fluoresc. Methods Study Biol. Membr.* (Eds.: Y. Mely, G. Duportail), Springer Science & Business Media, Berlin, **2012**.
- [102] T. K. L. Meyvis, S. C. D. Smedt, P. V. Oostveldt, J. Demeester, *Pharm. Res.* **1999**, 16, 1153–1162.
- [103] P. B. Ghosh, M. W. Whitehouse, *Biochem. J.* **1968**, 108, 155–156.
- [104] T. Yamaguchi, M. Asanuma, S. Nakanishi, Y. Saito, M. Okazaki, K. Dodo, M. Sodeoka, *Chem. Sci.* **2014**, 5, 1021–1029.
- [105] S. Fery-Forgues, J.-P. Fayet, A. Lopez, *J. Photochem. Photobiol. Chem.* **1993**, 70, 229–243.
- [106] A. Chattopadhyay, *Chem. Phys. Lipids* **1990**, 53, 1–15.
- [107] S. Lin, W. S. Struve, *Photochem. Photobiol.* **1991**, 54, 361–365.
- [108] P. Devaux, A. Herrmann, *Transmembrane Dynamics of Lipids*, John Wiley & Sons, Hoboken, **2011**.
- [109] S. Banhart, E. M. Saied, A. Martini, S. Koch, L. Aeberhard, K. Madela, C. Arenz, D. Heuer, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2014**, AAC.03457-14.
- [110] T. Arvinte, P. Wahl, C. Nicolau, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* **1987**, 899, 143–150.
- [111] J. C. McIntyre, R. G. Sleight, *Biochemistry (Mosc.)* **1991**, 30, 11819–11827.
- [112] R. Watanabe, N. Soga, T. Yamanaka, H. Noji, *Sci. Rep.* **2014**, 4, 7076.
- [113] A. Chattopadhyay, E. London, *Biochemistry (Mosc.)* **1987**, 26, 39–45.
- [114] D. Huster, P. Müller, K. Arnold, A. Herrmann, *Biophys. J.* **2001**, 80, 822–831.

- [115] H. Brockmann, *Pure Appl. Chem.* **1961**, 2, 405–424.
- [116] J. K. Wesener, *RÖMPP Online* **2005**, Solvatochromie.
- [117] M. S. J. Briggs, I. Bruce, J. N. Miller, C. J. Moody, A. C. Simmonds, E. Swann, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1997**, 1051–1058.
- [118] O. A. Kucherak, S. Oncul, Z. Darwich, D. A. Yushchenko, Y. Arntz, P. Didier, Y. Mély, A. S. Klymchenko, *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, 132, 4907–4916.
- [119] K. P. Bhabak, D. Proksch, S. Redmer, C. Arenz, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, 20, 6154–6161.
- [120] A. Datta, D. Mandal, S. K. Pal, K. Bhattacharyya, *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 10221–10225.
- [121] H. Otteneder, J. Hartmann-Schreiner, *RÖMPP Online* **2008**, Cumarin.
- [122] H. v. Pechmann, *Berichte Dtsch. Chem. Ges.* **1884**, 17, 929–936.
- [123] P. Wessig, N. Behrends, M. U. Kumke, U. Eisold, T. Meiling, C. Hille, *RSC Adv.* **2016**, 6, 33510–33513.
- [124] T. Furuta, S. S.-H. Wang, J. L. Dantzker, T. M. Dore, W. J. Bybee, E. M. Callaway, W. Denk, R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1999**, 96, 1193–1200.
- [125] W. Xu, Z. Zeng, J.-H. Jiang, Y.-T. Chang, L. Yuan, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2016**, 55, 13658–13699, *Angew. Chem.* **2016**, 128, 13858–13902.
- [126] E. A. Lemke, C. Schultz, *Nat. Chem. Biol.* **2011**, 7, 480–483.
- [127] R. Y. Tsien, *Biochemistry (Mosc.)* **1980**, 19, 2396–2404.
- [128] G. Gryniewicz, M. Poenie, R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **1985**, 260, 3440–3450.
- [129] K. M. Dean, Y. Qin, A. E. Palmer, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **2012**, 1823, 1406–1415.
- [130] T. Förster, *Ann. Phys.* **1948**, 437, 55–75.
- [131] S. Harekrushna, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* **2011**, 12, 20–30.
- [132] L. Stryer, *Annu. Rev. Biochem.* **1978**, 47, 819–846.
- [133] R. Y. Tsien, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, 48, 5612–5626, *Angew. Chem.* **2009**, 121, 5721–5736.
- [134] G. Zlokarnik, P. A. Negulescu, T. E. Knapp, L. Mere, N. Burres, L. Feng, M. Whitney, K. Roemer, R. Y. Tsien, *Science* **1998**, 279, 84–88.
- [135] O. Wichmann, J. Wittbrodt, C. Schultz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, 45, 508–512, *Angew. Chem.* **2006**, 118, 522–527.
- [136] M. Awais, M. Sato, K. Sasaki, Y. Umezawa, *Anal. Chem.* **2004**, 76, 2181–2186.
- [137] J. L. Vinkenborg, T. J. Nicolson, E. A. Bellomo, M. S. Koay, G. A. Rutter, M. Merckx, *Nat. Methods* **2009**, 6, 737–740.
- [138] K. Kikuchi, H. Takakusa, T. Nagano, *TrAC Trends Anal. Chem.* **2004**, 23, 407–415.
- [139] X. Zhang, Y. Xiao, X. Qian, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2008**, 120, 8145–8149.
- [140] J. Zhang, R. Wang, Z. Zhu, L. Yi, Z. Xi, *Tetrahedron* **2015**, 71, 8572–8576.
- [141] X. Yang, Y. Zhou, X. Zhang, S. Yang, Y. Chen, J. Guo, X. Li, Z. Qing, R.-H. Yang, *Chem. Commun.* **2016**, 52, 10289–10292.
- [142] H. Takakusa, K. Kikuchi, Y. Urano, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, T. Nagano, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 1653–1657.
- [143] K. P. Bhabak, A. Hauser, S. Redmer, S. Banhart, D. Heuer, C. Arenz, *ChemBioChem* **2013**, 14, 1049–1052.
- [144] M. Göppert-Mayer, *Ann. Phys.* **1931**, 401, 273–294.
- [145] J. K. Wesener, *RÖMPP Online* **2005**, Mehrphotonenspektroskopie.
- [146] W. Denk, J. H. Strickler, W. W. Webb, *Science* **1990**, 248, 73–76.
- [147] F. Helmchen, W. Denk, *Nat. Methods* **2005**, 2, 932–940.
- [148] P. Theer, M. T. Hasan, W. Denk, *Opt. Lett.* **2003**, 28, 1022–1024.
- [149] E. F. Elslager, D. F. Worth, *J. Med. Chem.* **1970**, 13, 370–376.

- [150] L. Liu, R. Breslow, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 12110–12111.
- [151] J. G. Mina, J. A. Mosely, H. Z. Ali, P. W. Denny, P. G. Steel, *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1823–1830.
- [152] H. Yang, L. S. Liebeskind, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 2993–2995.
- [153] T. Yamamoto, H. Hasegawa, S. Ishii, S. Kaji, T. Masuyama, S. Harada, S. Katsumura, *Tetrahedron* **2008**, *64*, 11647–11660.
- [154] S. Kotha, M. K. Dipak, *Tetrahedron* **2012**, *68*, 397–421.
- [155] A. Fürstner, O. R. Thiel, L. Ackermann, H.-J. Schanz, S. P. Nolan, *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 2204–2207.
- [156] B. R. Galan, K. P. Kalbarczyk, S. Szczepankiewicz, J. B. Keister, S. T. Diver, *Org. Lett.* **2007**, *9*, 1203–1206.
- [157] R. S. Lankalapalli, A. Ouro, L. Arana, A. Gómez-Muñoz, R. Bittman, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 8844–8847.
- [158] H. R. Ing, R. H. F. Manske, *J. Chem. Soc.* **1926**, *129*, 2348–2351.
- [159] V. Wascholowski, A. Giannis, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 827–830, *Angew. Chem.* **2006**, *118*, 841–845.
- [160] J. Folch, M. Lees, G. H. S. Stanley, *J. Biol. Chem.* **1957**, *226*, 497–509.
- [161] S. Mazères, V. Schram, J. F. Tocanne, A. Lopez, *Biophys. J.* **1996**, *71*, 327–335.
- [162] S. Nie, S. R. Emory, *Science* **1997**, *275*, 1102–1106.
- [163] T. Pinkert, D. Furkert, T. Korte, A. Herrmann, C. Arenz, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 2790–2794, *Angew. Chem.* **2017**, *129*, 2834–2838.
- [164] C. Rhein, P. Tripal, A. Seebahn, A. Konrad, M. Kramer, C. Nagel, J. Kemper, J. Bode, C. Mühle, E. Gulbins, et al., *PLoS ONE* **2012**, *7*, DOI 10.1371/journal.pone.0035467.
- [165] C. Berney, G. Danuser, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 3992–4010.
- [166] H. Chen, H. L. Puhl, S. V. Koushik, S. S. Vogel, S. R. Ikeda, *Biophys. J.* **2006**, *91*, L39–L41.
- [167] S. Yegneswaran, H. Deguchi, J. H. Griffin, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 14614–14621.
- [168] T. Kirkegaard, J. Gray, D. A. Priestman, K.-L. Wallom, J. Atkins, O. D. Olsen, A. Klein, S. Drndarski, N. H. T. Petersen, L. Ingemann, et al., *Sci. Transl. Med.* **2016**, *8*, 118–134.
- [169] T. Levade, M. Leruth, D. Graber, A. Moisand, S. Vermeersch, R. Salvayre, P. J. Courtoy, *J. Lipid Res.* **1996**, *37*, 2525–2538.
- [170] E. L. Smith, E. H. Schuchman, *Mol. Ther.* **2008**, *16*, 1565–1571.
- [171] X. Zha, L. M. Pierini, P. L. Leopold, P. J. Skiba, I. Tabas, F. R. Maxfield, *J. Cell Biol.* **1998**, *140*, 39–47.
- [172] P. A. Lang, M. Schenck, J. P. Nicolay, J. U. Becker, D. S. Kempe, A. Lupescu, S. Koka, K. Eisele, B. A. Klarl, H. Rübber, et al., *Nat. Med.* **2007**, *13*, 164–170.
- [173] K. A. Rozenova, G. M. Deevska, A. A. Karakashian, M. N. Nikolova-Karakashian, *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 21103–21113.
- [174] F. H. Allen, O. Kennard, D. G. Watson, L. Brammer, A. G. Orpen, R. Taylor, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1987**, S1–S19.
- [175] H. Beyer, W. Walter, *Lehrbuch der organischen Chemie*, Hirzel, Stuttgart, **1991**.
- [176] L. E. Quintern, G. Weitz, H. Nehr Korn, J. M. Tager, A. Schram, K. Sandhoff, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Lipids Lipid Metab.* **1987**, *922*, 323–336.
- [177] H. Grassmé, E. Gulbins, B. Brenner, K. Ferlinz, K. Sandhoff, K. Harzer, F. Lang, T. F. Meyer, *Cell* **1997**, *91*, 605–615.
- [178] H. H. Paradies, *J. Phys. Chem.* **1980**, *84*, 599–607.
- [179] R. Ni, J. Zhou, N. Hossain, Y. Chau, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2016**, *106*, Part A, 3–26.
- [180] C. Goldmann, N. Stolte, T. Nisslein, G. Hunsmann, W. Lücke, H. Petry, *J. Virol. Methods* **2000**, *90*, 85–90.

- [181] C. Schultz, *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 885–898.
- [182] H. E. Gottlieb, V. Kotlyar, A. Nudelman, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7512–7515.
- [183] G. Satzinger, *Justus Liebigs Ann. Chem.* **1960**, *638*, 159–173.
- [184] K. W. Kohn, A. Orr, P. M. O'Connor, L. J. Guziec, F. S. Guziec, *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 67–72.
- [185] M. Lukáč, J. Mojžiš, G. Mojžišová, M. Mrva, F. Ondriska, J. Valentová, I. Lacko, M. Bukovský, F. Devínsky, J. Karlovská, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4970–4977.
- [186] S. Hirano, S. Ichikawa, A. Matsuda, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2005**, *44*, 1854–1856, *Angew. Chem.* **2005**, *117*, 1888–1890.
- [187] E. Faurel-Paul, K. Yoshida, M. Sépulcre, H. Dhimane, Y. L. Merrer, *Synth. Commun.* **2009**, *39*, 459–474.





## 8 | Abkürzungen

=	Doppelbindung (NMR)	<i>et al.</i>	und andere
$\Delta f$	Polarisierbarkeit des Mediums	<i>etc.</i>	<i>et cetera</i> , und so weiter
1PE	Einphotonenanregung	Ex	Anregung
2PE	Zweiphotonenanregung	FA	Ameisensäure
Abb.	Abbildung	FA	Ameisensäure
ABD	7-Amino-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-	FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
ABP	<i>activity-based probes</i>	FCI	Fonds der chemischen Industrie
Ac	Acetyl-	FCS	fötales Kälberserum
aLUV	<i>anionic large unilamellar vesicle</i>	FLD	Fluoreszenzdetektor
APT	<i>attached proton test</i>	FP	fluoreszierendes Protein
aq.	wässrig	$F_r$	residualer FRET
ar	aromatisch	FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
ASM	saure Sphingomyelinase	FRET	FÖRSTER-Resonanzenergietransfer
ATP	Adenosintriphosphat	FT	<i>FOURIER transform</i>
ber.	berechnet	gef.	gefunden
BMP	Bis(monoacylglycero)phosphat	ges.	gesättigt
Bn	Benzyl-	GFP	grün fluoreszierendes Protein
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl-	ggf.	gegebenenfalls
Boc <sub>2</sub> O	Di- <i>tert</i> -butyldicarbonat	Gl.	Gleichung
bs	breites Singulett (NMR)	$h$	PLANCK-Konstante
BSA	bovines Serumalbumin	HeLa	humane Zervixkarzinom-Zelllinie
Bu	n-Butyl-	HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-yl]-ethansulfonsäure
bzw.	beziehungsweise	HMU	6-Hexadecanoylamino-4-methyl-umbelliferon
$c$	molare Konzentration	HMUPC	6-Hexadecanoylamino-4-methyl-umbelliferylphosphorylcholin
CAD	<i>cationic amphiphilic drugs</i>	HNPPC	2-Hexadecanoylamino-4-nitrophenyl-phosphorylcholin
Cer	Ceramid	HOSu	<i>N</i> -Hydroxysuccinimid
CH	Cyclohexan	HPLC	Hochleistungs-/Hochdruck-LC
Chol	Cholesterol	HRMS	hochaufgelöste Massenspektrometrie
ChoP	Phosphocholin(analogon)	$IC_{50}$	Inhibitorkonzentration mit 50% des maximalen Effekts <i>in vitro</i>
CNE	Cyanoethyl-	Im	Imidazol
CoASH	Coenzym A	iPr	Isopropyl-
d	Dublett (NMR)	IR	Infrarotstrahlung
DC	Dünnschichtchromatographie	IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie
DCC	<i>N,N'</i> -Dicyclohexylcarbodiimid	$J$	Kopplungskonstante (NMR)
DCIA	7-Diethylamino-3-[4-(iodacetamido)-phenyl]-4-methylcumarin	$k$	Geschwindigkeitskonstante
dest.	destilliert	kDa	Kilodalton
DIBALH	Diisobutylaluminiumhydrid	$K_m$	MICHAELIS-Konstante
DIC	Differentialinterferenzkontrast	KO	(ASM) <i>knockout</i>
DIPEA	Diisopropylethylamin	LC	Flüssigkeitschromatographie
DMAP	4- <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin	LDL	<i>low density lipoprotein</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Lit.	Literatur
DMF	<i>N,N</i> -Dimethylformamid	LTQ	<i>linear trap quadrupole</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	m	Multipllett (NMR)
DNS	Desoxyribonukleinsäure	$m$	Masse, Medianabstand in Tab. 3-3
$E$	FRET-Effizienz	MCC	7-Methoxycumarin-3-carboxylat-
EA	Essigsäureethylester	mCPBA	<i>meta</i> -Chlorperbenzoesäure
EDC	<i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N'</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid	Me	Methyl-
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MEF	murine embryonale Fibroblasten
Em	Emission	MHz	Megahertz
eq.	Äquivalente	MOM	Methoxymethyl-
ER	Endoplasmatisches Retikulum		
ESI	Elektrosprayionisation		
ESIPT	<i>excited state intramolecular proton transfer</i>		
Et	Ethyl-		

MPM	Multiphotonenanregungsmikroskopie	SMS	Sphingomyelinsynthase
$n$	Brechungsindex	$S_x$	x-ter elektronischer Singulettzustand
n.b.	nicht bestimmt	$t$	Triplett (NMR)
NA	Numerische Apertur	$t$	(Inkubations-)Zeit
$N_A$	AVOGADRO-Konstante	Tab.	Tabelle
NADP <sup>+</sup>	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat	TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid, Bu <sub>4</sub> NF
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat	TBDPS	<i>tert</i> -Butyldiphenylsilyl-
NBD	7-Nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl-	TBLAH	Lithium-tri- <i>tert</i> -butoxyaluminumhydrid, LiAl(O $t$ Bu) <sub>3</sub> H
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin	TBS	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl-
NMR	Kernmagnetische Resonanz	$t$ Bu	<i>tert</i> -Butyl-
NPCI	2-Chlor-5,5-dimethyl-1,3,2-dioxaphosphorinan-2-oxid	TFA	Trifluoressigsäure, CF <sub>3</sub> COOH
NR	9-Diethylamino-5-oxo-5 <i>H</i> -benzo[a]-phenoxazin-2-yl-	THF	Tetrahydrofuran
NSM	neutrale Sphingomyelinase	TICT	<i>twisted intramolecular charge transfer</i>
OE	(ASM) überexprimierend	TMS	Tetramethylsilan, Me <sub>4</sub> Si
p	Pentett (NMR)	TNF	Tumornekrosefaktor
PA	Phosphatidsäure, Phosphatidat	tr.	trocken
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7.4	Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
PC	Phosphatidylcholin (Lecithin)	Ts	<i>para</i> -Toluensulfonyl
PCT	<i>photoinduced charge transfer</i>	$T_x$	x-ter elektronischer Triplettzustand
PET	<i>photoinduced electron transfer</i>	TX-100	4- <i>tert</i> -Octylphenoxypolyethoxyethanol, ein nicht-ionisches Detergenz
Ph	Phenyl-	u.U.	unter Umständen
Phth	<i>ortho</i> -Phthaloyl-	unges.	ungesättigt
PhthO	Phthalsäureanhydrid	UV	Ultraviolettstrahlung (100-380 nm)
PLD	Phospholipase D	v.a.	vor allem
PMT	<i>photomultiplier tube</i>	var.	variabel
PS	Phasentrennungs-gestützte Signalverstärkung	vgl.	vergleiche
PtdE	Phosphatidylethanolamin, auch <i>PE</i>	Vis	sichtbares Spektrum (380-780 nm)
PtdS	Phosphatidylserin, auch <i>PS</i>	$v_{rel}$	relative Reaktionsgeschwindigkeit
q	Quadruplett (NMR)	$V_x$	x-ter Vibrationszustand
$Q$	Strahlungsenergie, auch $E$	WT	Wildtyp
quant.	quantitativ	$z$	Ladung
$r$	Abstand	z.B.	zum Beispiel
$R_0$	FÖRSTER-Radius	z.T.	zum Teil
RC	<i>ratio change</i>	$\beta$	Massenkonzentration
Ref.	Referenz	$\beta$ -OG	$\beta$ -Octylglucopyranosid
rek.	rekombinant	$\delta$	chemische Verschiebung
$R_f$	Retentionsfaktor	$\epsilon_M$	Permittivität des Mediums
RNS	Ribonukleinsäure	$\epsilon_\lambda$	Extinktionskoeffizient
rpm	Umdrehungen pro Minute	$\kappa^2$	Orientierungsfaktor
RT	Raumtemperatur	$\lambda$	Wellenlänge
$R_t$	Retentionszeit	$\mu$	Dipolmoment
SEC	Größenausschlusschromatographie	$\bar{\nu}$	Wellenzahl
Sf21	<i>Spodoptera frugiperda ovary cells</i>	$\sigma$	Standardabweichung
SFC	<i>supercritical fluid chromatography</i>	$\sigma_2$	Zweiphotonenwirkungsquerschnitt
SM	Sphingomyelin	$\tau$	Fluoreszenzlebensdauer
		$\Phi$	Quantenausbeute
		$J$	Überlappungsintegral

## 9 | Anhang

### 9-1 | Chromatogramme

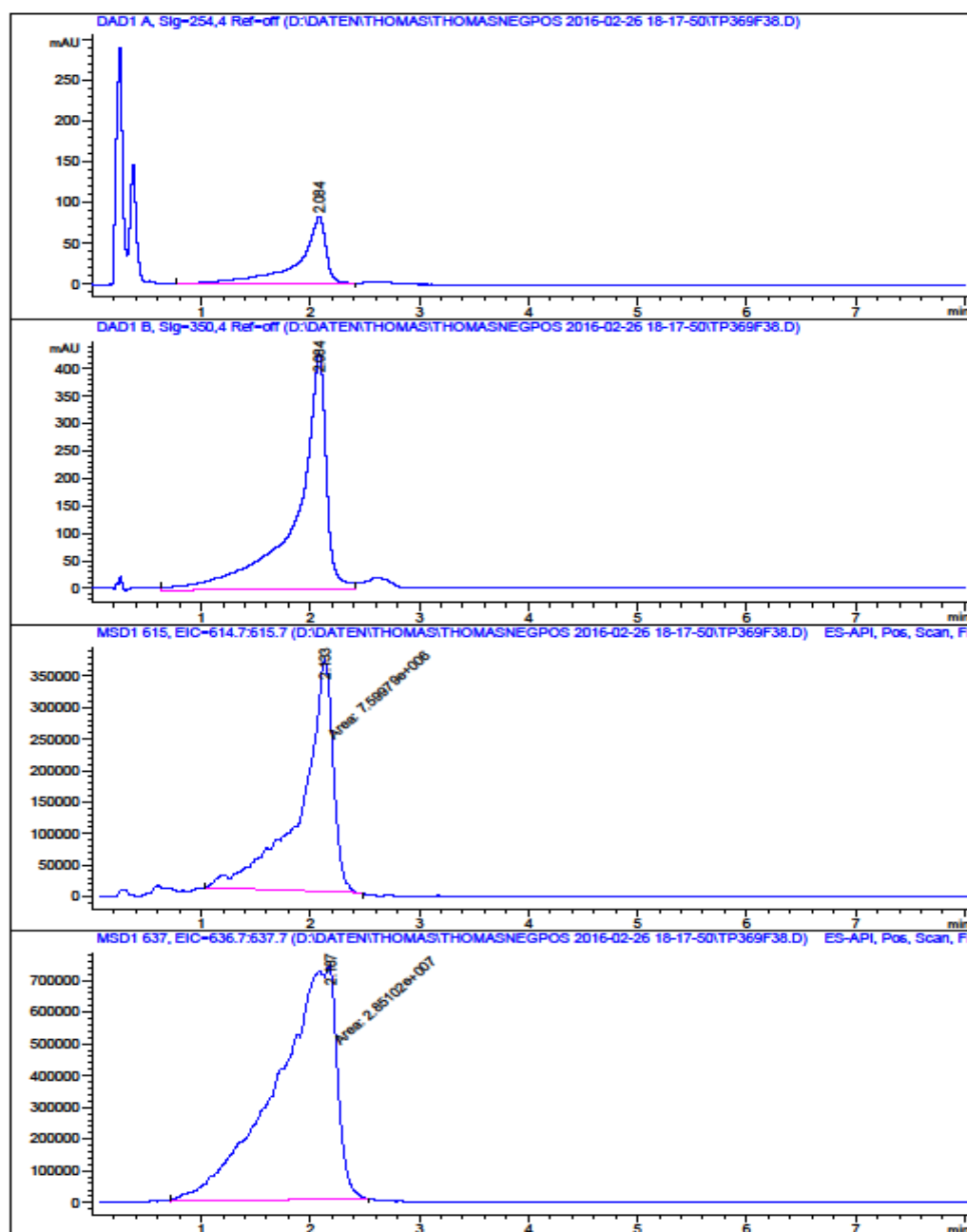


Abb. 9-1 | HPLC-Chromatogramm für synthetisches MCC-Cer **5** | isokratisch (85% MeOH in H<sub>2</sub>O, 0.1% FA), 0.4 mL min<sup>-1</sup>, von oben nach unten: UV-Spur 254 nm, UV-Spur 350 nm, Massenspur  $m/z$  615<sup>+</sup> [MCC-Cer+H]<sup>+</sup>, Massenspur  $m/z$  637<sup>+</sup> [MCC-Cer+Na]<sup>+</sup>.

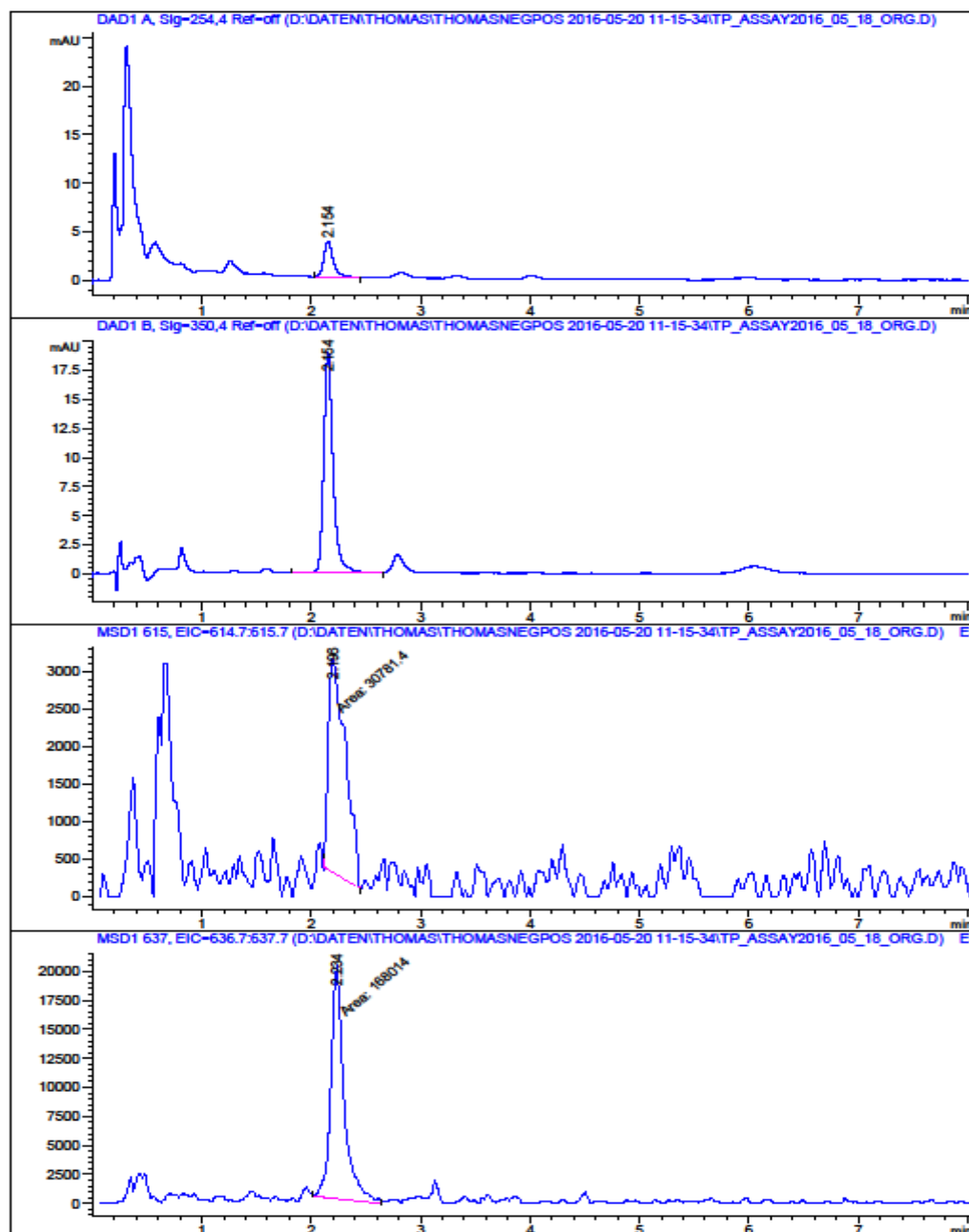


Abb. 9-2 | HPLC-Chromatogramm für nach Folch extrahierte Reaktionslösung von 1  $\mu$ M Sonde **2** die in aLUVs inkorporiert und mit  $2 \cdot 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$  rek. humaner ASM für 120 min inkubiert wurde | isokratisch (85% MeOH in  $\text{H}_2\text{O}$ , 0.1% FA),  $0.4 \text{ mL min}^{-1}$ , von oben nach unten: UV-Spur 254 nm, UV-Spur 350 nm, Massenspur  $m/z$  615<sup>+</sup> [MCC-Cer+H]<sup>+</sup>, Massenspur  $m/z$  637<sup>+</sup> [MCC-Cer+Na]<sup>+</sup>.

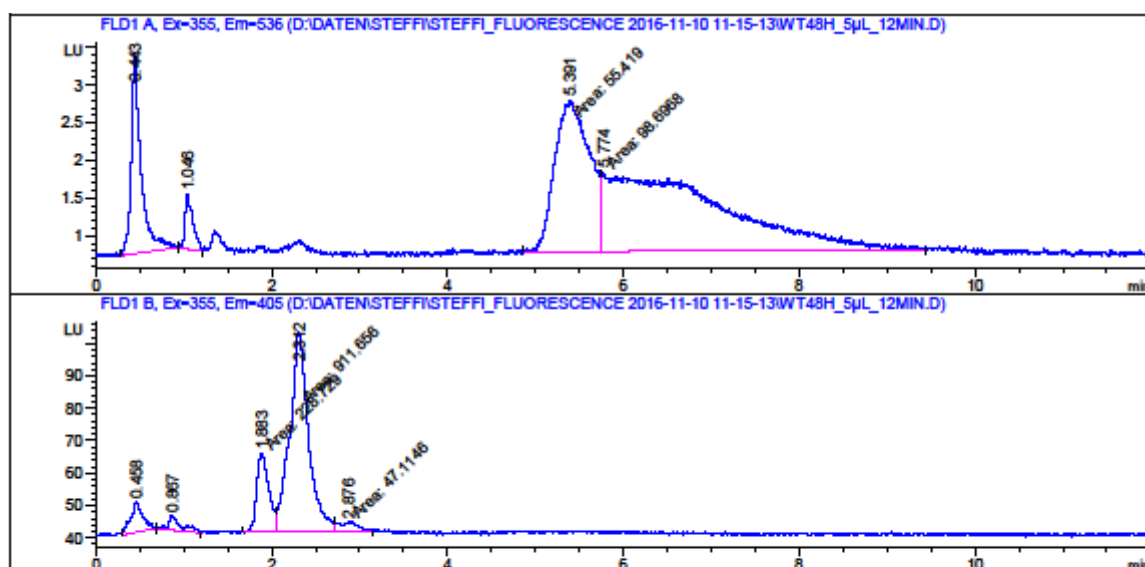


Abb. 9-3 | HPLC-Chromatogramm für nach Folch extrahierte WT-MEFs nach 48 h Inkubation mit 1  $\mu$ M Sonde 2 | isokratisch (85% MeOH in H<sub>2</sub>O, 0.1% FA), 0.4 mL min<sup>-1</sup>, von oben nach unten: FLD-Spur 355 nm/536 nm, FLD-Spur 355 nm/405 nm.

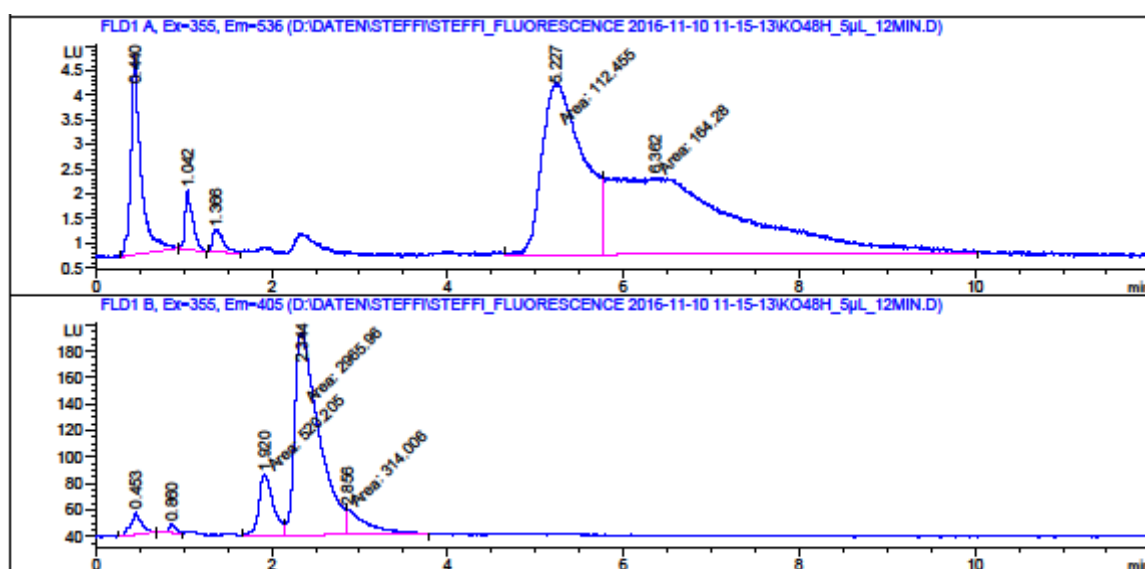


Abb. 9-4 | HPLC-Chromatogramm für nach Folch extrahierte KO-MEFs nach 48 h Inkubation mit 1  $\mu$ M Sonde 2 | isokratisch (85% MeOH in H<sub>2</sub>O, 0.1% FA), 0.4 mL min<sup>-1</sup>, von oben nach unten: FLD-Spur 355 nm/536 nm, FLD-Spur 355 nm/405 nm.

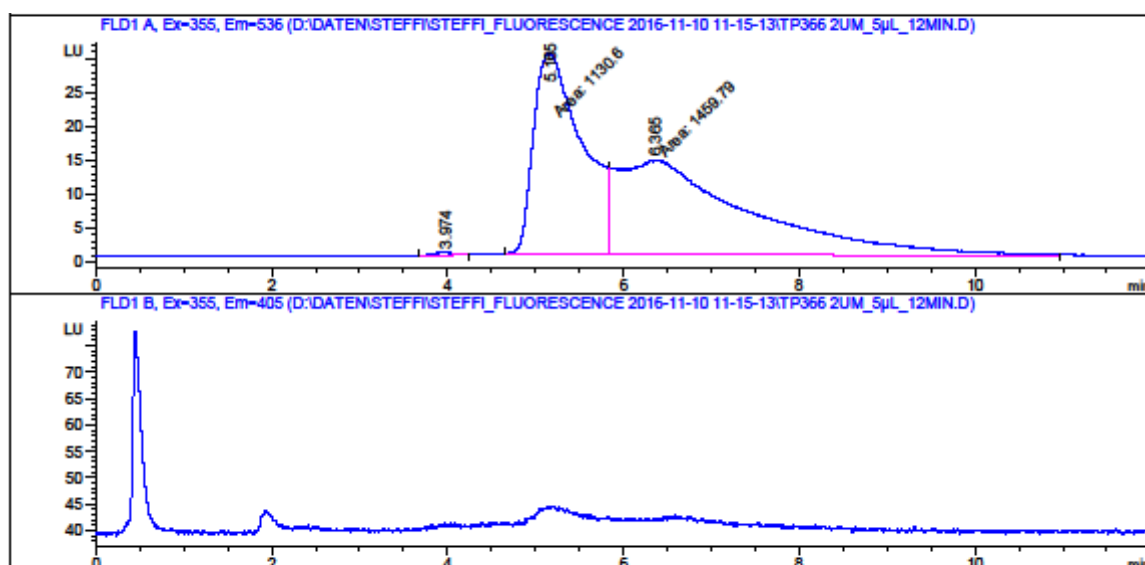


Abb. 9-5 | HPLC-Chromatogramm für 0.01 pmol Sonde **2** | isokratisch (85% MeOH in H<sub>2</sub>O, 0.1% FA), 0.4 mL min<sup>-1</sup>, von oben nach unten: FLD-Spur 355 nm/536 nm, FLD-Spur 355 nm/405 nm.

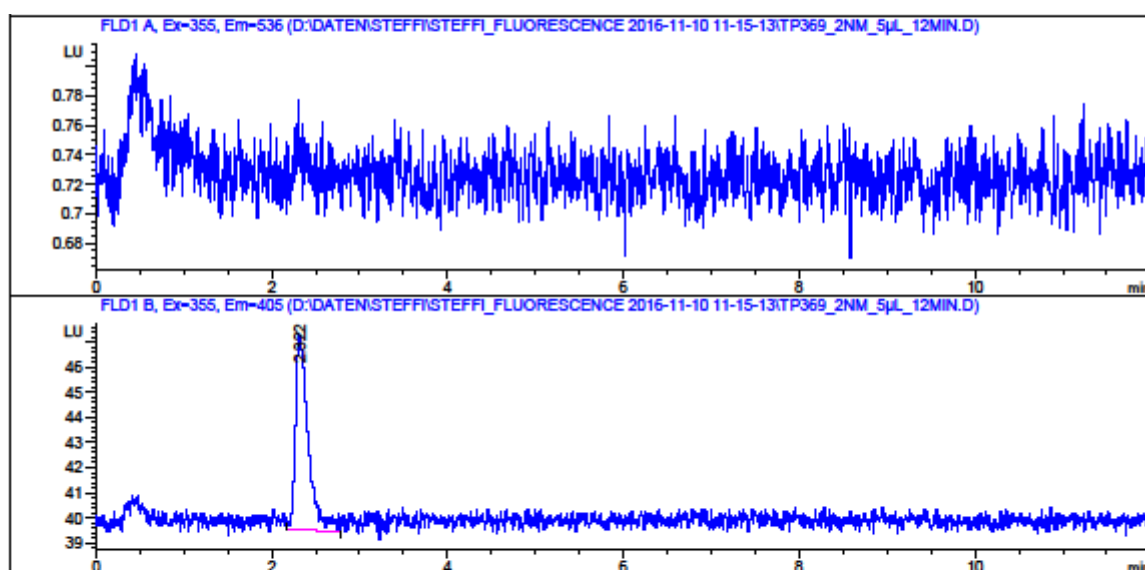


Abb. 9-6 | HPLC-Chromatogramm für 0.01 pmol MCC-Cer **5** | isokratisch (85% MeOH in H<sub>2</sub>O, 0.1% FA), 0.4 mL min<sup>-1</sup>, von oben nach unten: FLD-Spur 355 nm/536 nm, FLD-Spur 355 nm/405 nm.

Tab. 9-1 | Mittels HPLC-FLD bestimmte Mengen extrahierter Lipide nach Inkubation von WT- bzw OE-Zellen mit 1 µM Sonde **2** über die angegebenen Zeiträume | OE-Zellen wurden durch Transfektion eines ASM-codierenden Plasmids in WT-Zellen 24 h vor Zugabe der Sonde **2** erhalten.

Inkubationszeit / h	WT Signalfäche MCC-Cer	OE Signalfäche MCC-Cer	WT Signalfäche Sonde 2	OE Signalfäche Sonde 2
1	307,12	498,97	580,13	338,95
6	379,32	760,05	693,88	721,60
24	1230,31	1728,82	463,88	421,69
48	689,93	903,79	180,56	195,53

## 9-2 | Absorptionsspektren

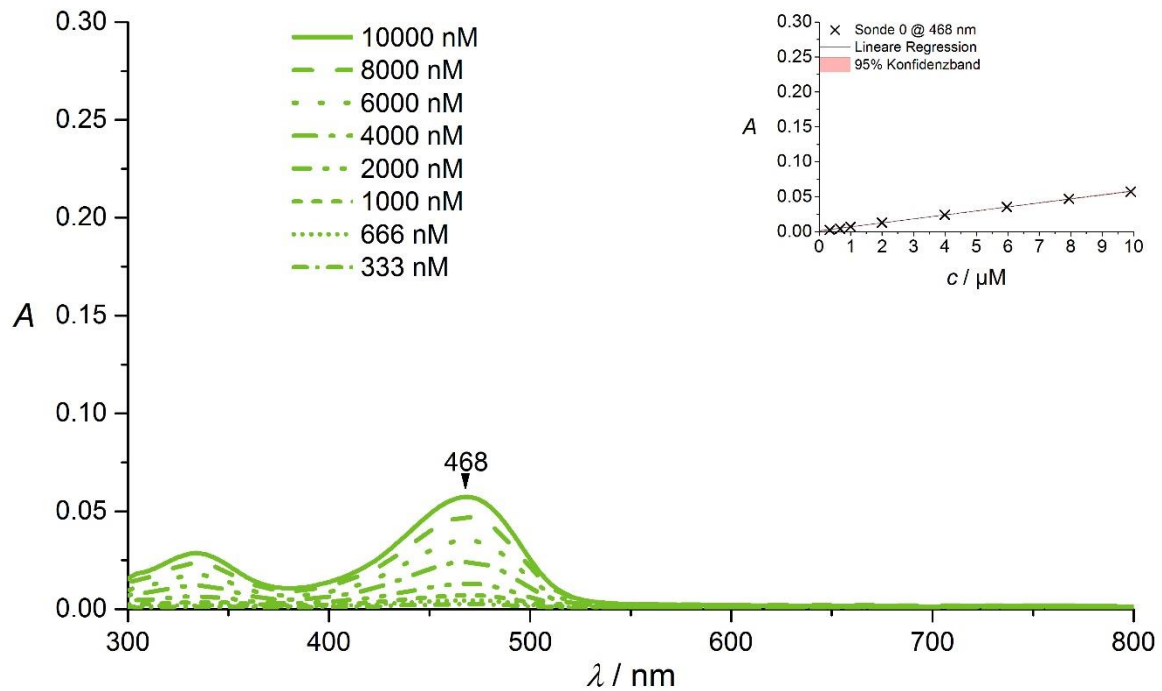


Abb. 9-7 | Absorptionsspektren von Sonde 0 | Einsatz: lineare Regression am Maximum, Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100, Schichtdicke  $d = 1$  cm.

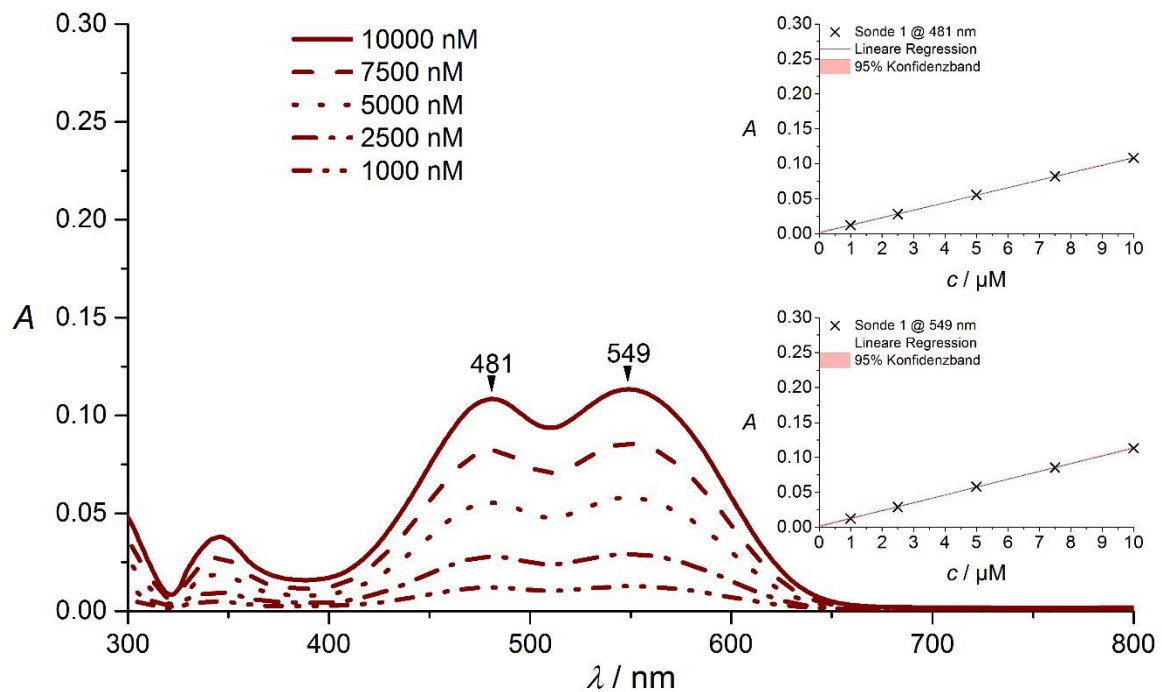


Abb. 9-8 | Absorptionsspektren von Sonde 1 | Einsatz: lineare Regression am Maximum, Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100, Schichtdicke  $d = 1$  cm.

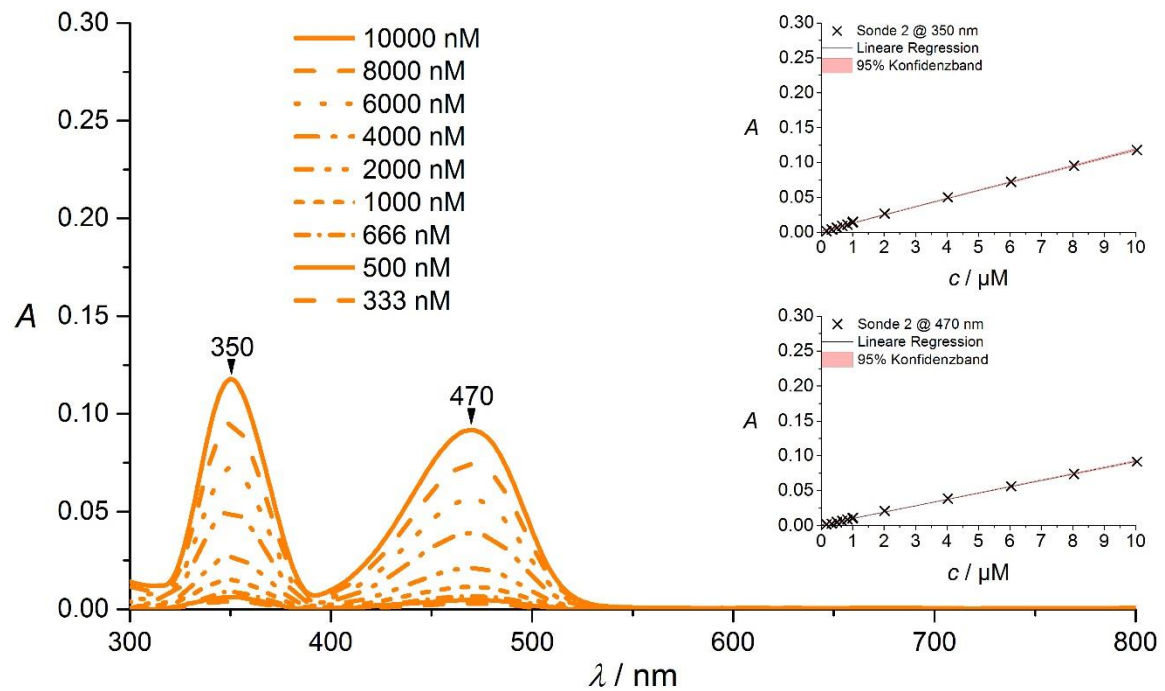


Abb. 9-9 | Absorptionsspektren von Sonde 2 | Einsatz: lineare Regression am Maximum, Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1% TX-100, Schichtdicke  $d = 1$  cm.

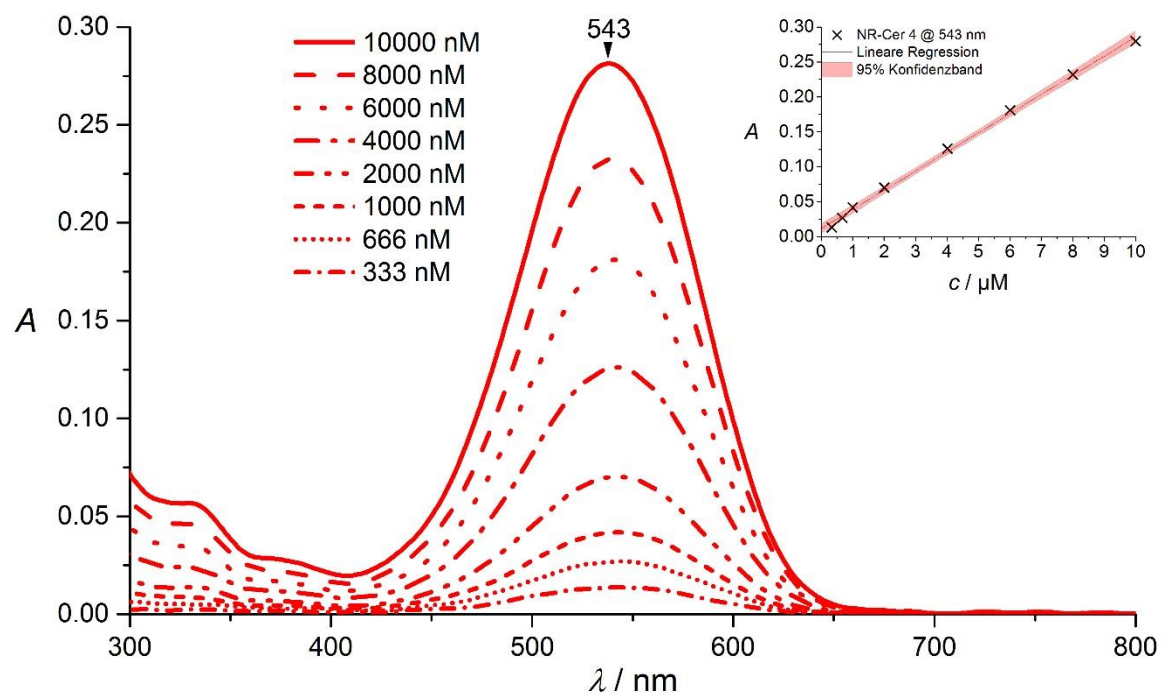


Abb. 9-10 | Absorptionsspektren von NR-Cer 4 | Einsatz: lineare Regression am Maximum, Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1% TX-100, Schichtdicke  $d = 1$  cm.



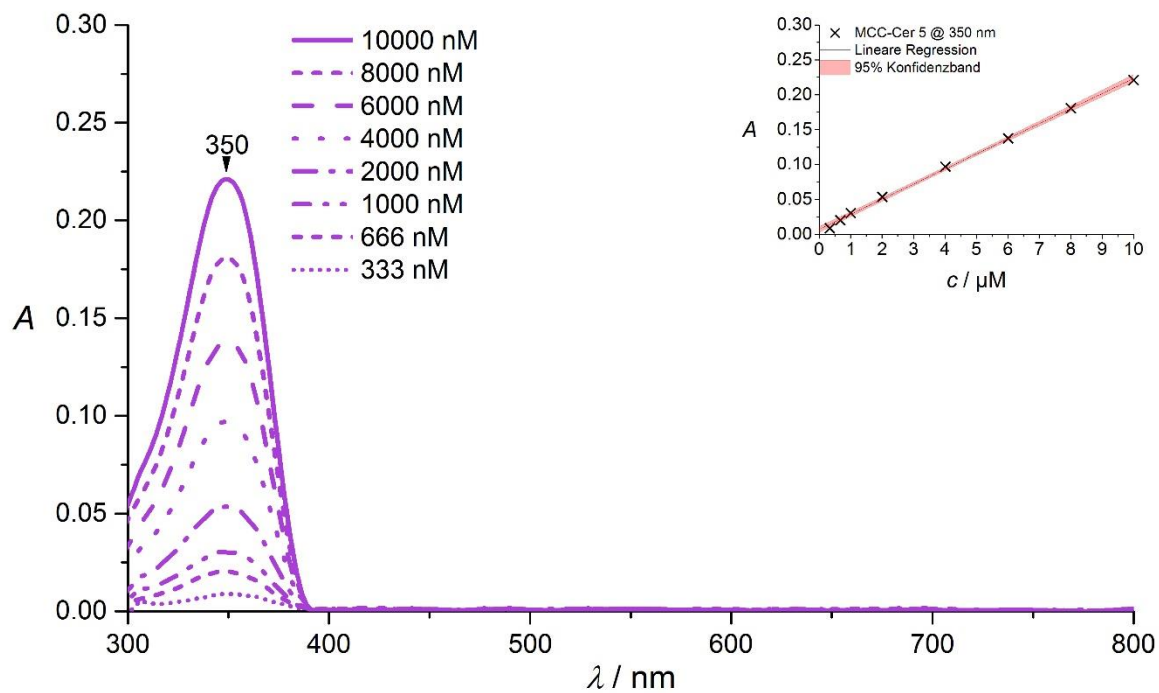


Abb. 9-11 | Absorptionsspektren von MCC-Cer 5 | Einsatz: lineare Regression am Maximum, Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100, Schichtdicke  $d = 1$  cm.

### 9-3 | Fluoreszenzspektren

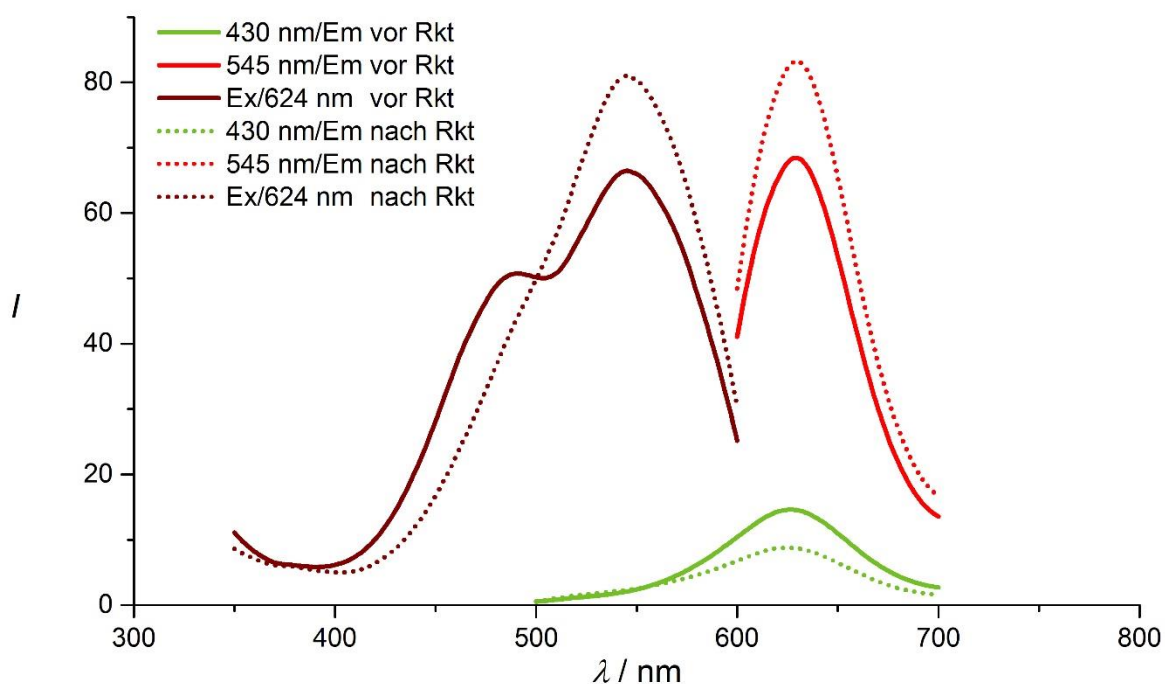


Abb. 9-12 | Fluoreszenzanregungsspektren (violett, grün) und Fluoreszenzemissionsspektren (orange, schwarz) der Sonde **1** vor (—) und nach (···) der Reaktion mit rek. humaner ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ gL}^{-1}$ ) |  $t = 90 \text{ min}$ , Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1% TX-100.

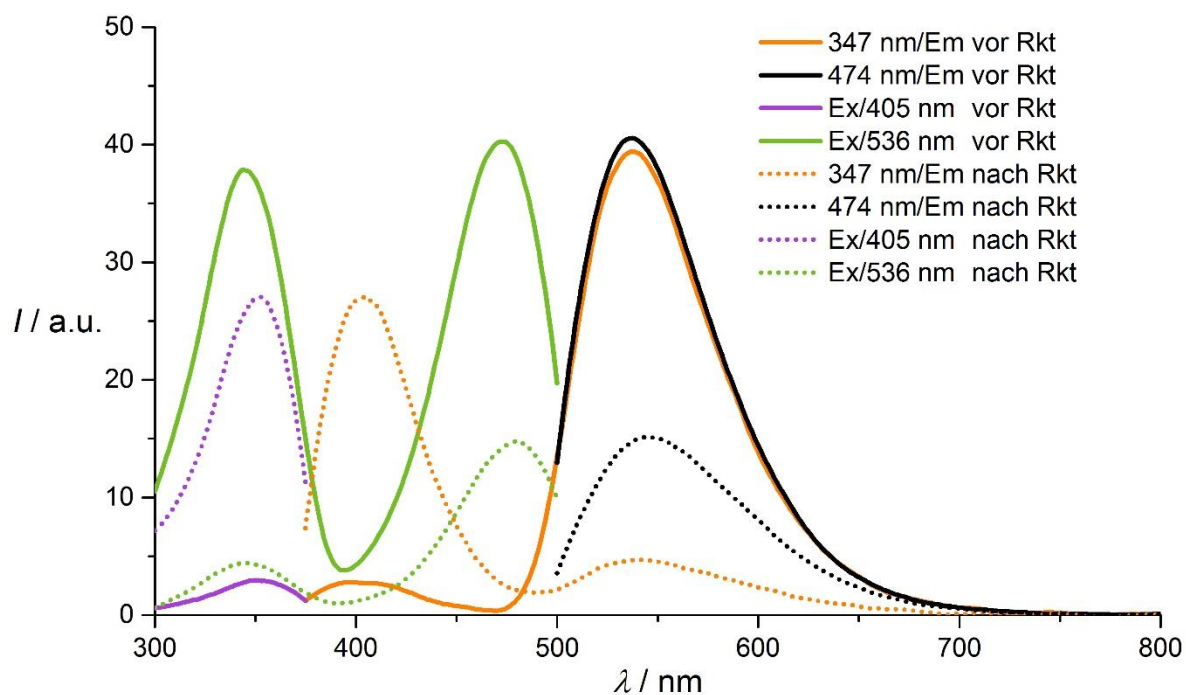


Abb. 9-13 | Fluoreszenzanregungsspektren (violett, grün) und Fluoreszenzemissionsspektren (orange, schwarz) der Sonde **2** vor (—) und nach (···) der Reaktion mit rek. humaner ASM ( $\beta = 2 \cdot 10^{-3} \text{ gL}^{-1}$ ) |  $t = 90 \text{ min}$ , Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM  $\text{ZnSO}_4$ , 0.1% TX-100.

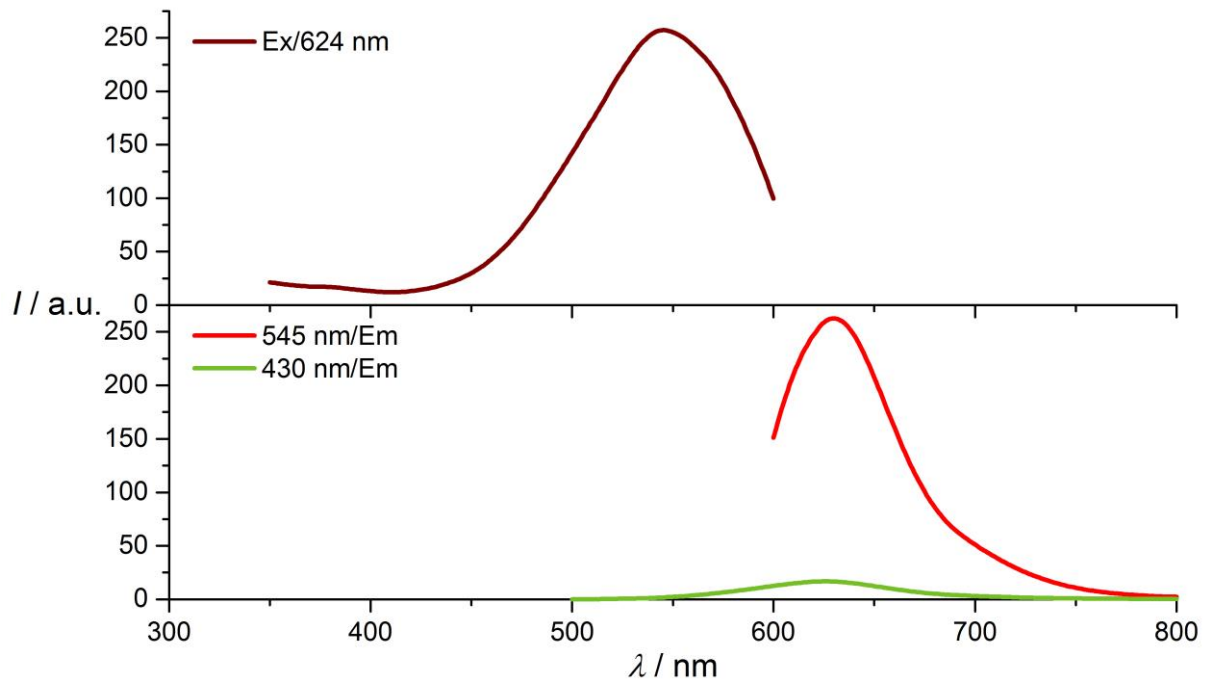


Abb. 9-14 | Fluoreszenzanregungsspektren (oben) und Fluoreszenzemissionsspektren (unten) von NR-Cer **4**, einem der erwarteten Spaltungsprodukte der ASM-vermittelten Hydrolyse der Sonde **1** | Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100.

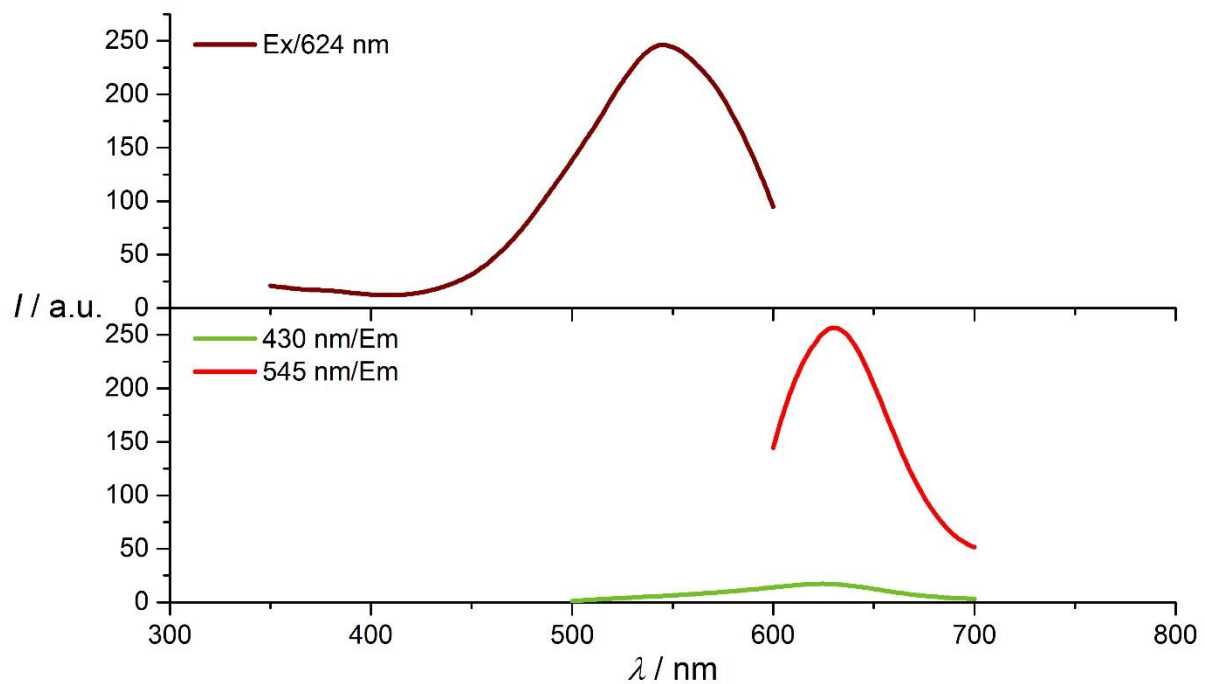


Abb. 9-15 | Fluoreszenzanregungsspektren (oben) und Fluoreszenzemissionsspektren (unten) einer 1:1 Mischung von NBD-Cho **3** und NR-Cer **4**, den erwarteten Spaltungsprodukten der ASM-vermittelten Hydrolyse der Sonde **1** | Medium: 0.1 M NaOAc pH 5.0, 150 mM NaCl, 0.1 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.1% TX-100.

## 9-4 | Mikroskopieaufnahmen

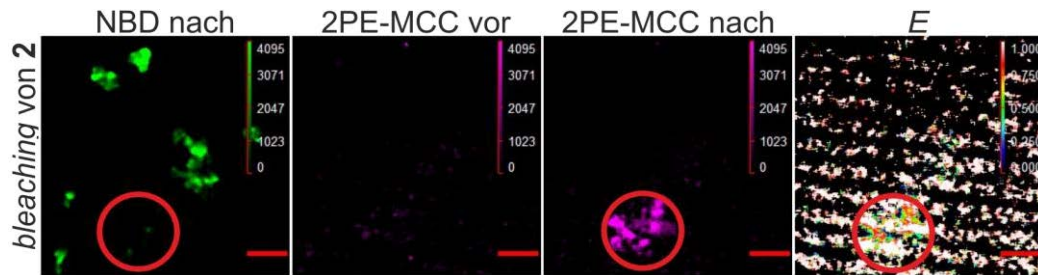


Abb. 9-16 | FRET-Effizienz auf *lipid beads*, die mit anionischen Liposomen (aLUVs) beschichtet wurden, welche ihrerseits mit Sonde **2** dotiert wurden | Das *bleaching* des FRET-Akzeptors NBD erfolgte im markierten Areal (roter Kreis). von links nach rechts: *post-bleach* NBD nach Anregung bei 488 nm, *pre-bleach* MCC nach Zweiphotonenanregung, *post-bleach* MCC nach Zweiphotonenanregung, daraus berechnete FRET-Effizienz *E*. Die Streifen sind ein Artefakt durch Fremdlicht. Der rote Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

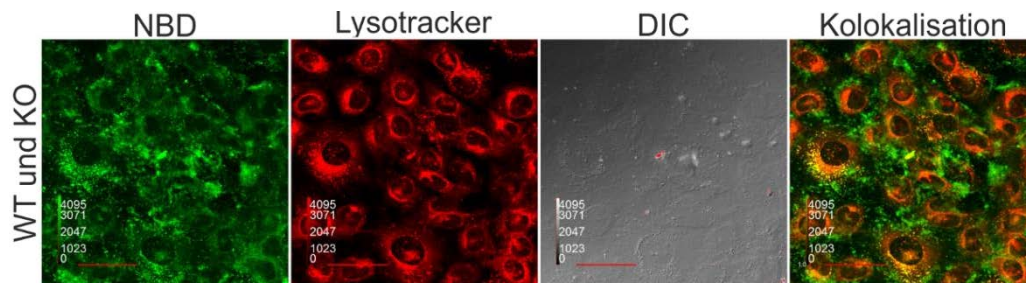


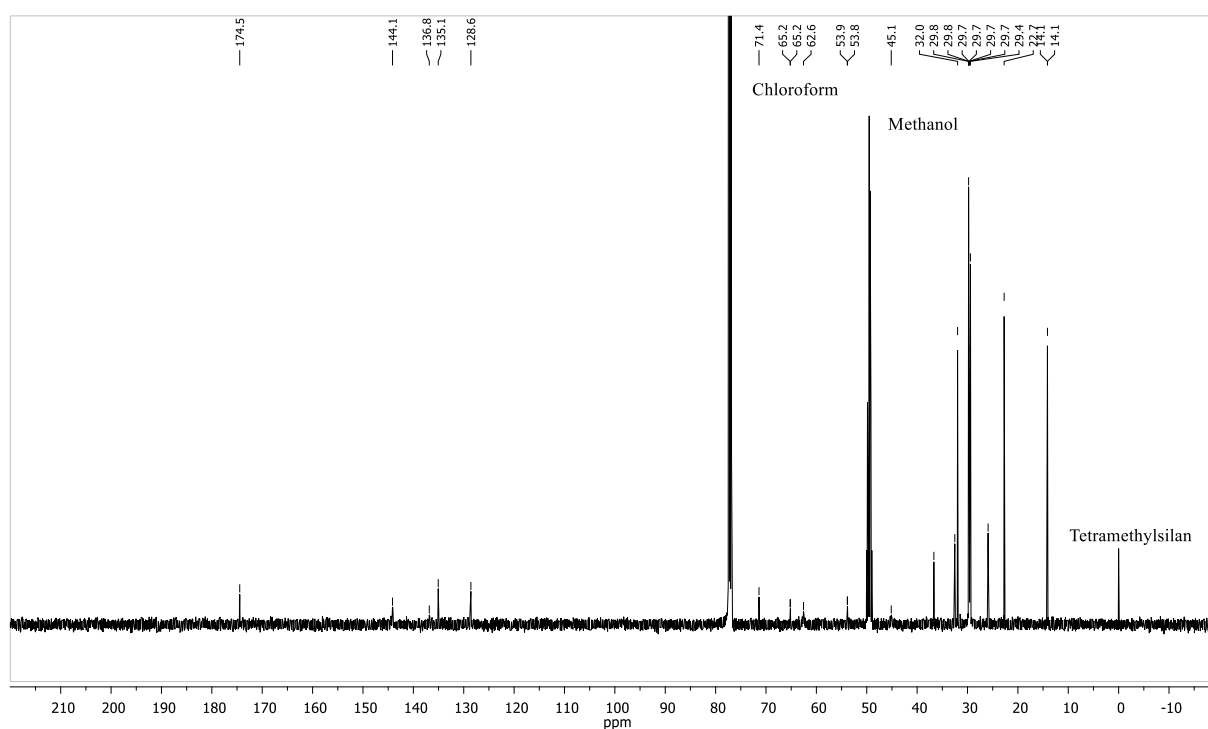
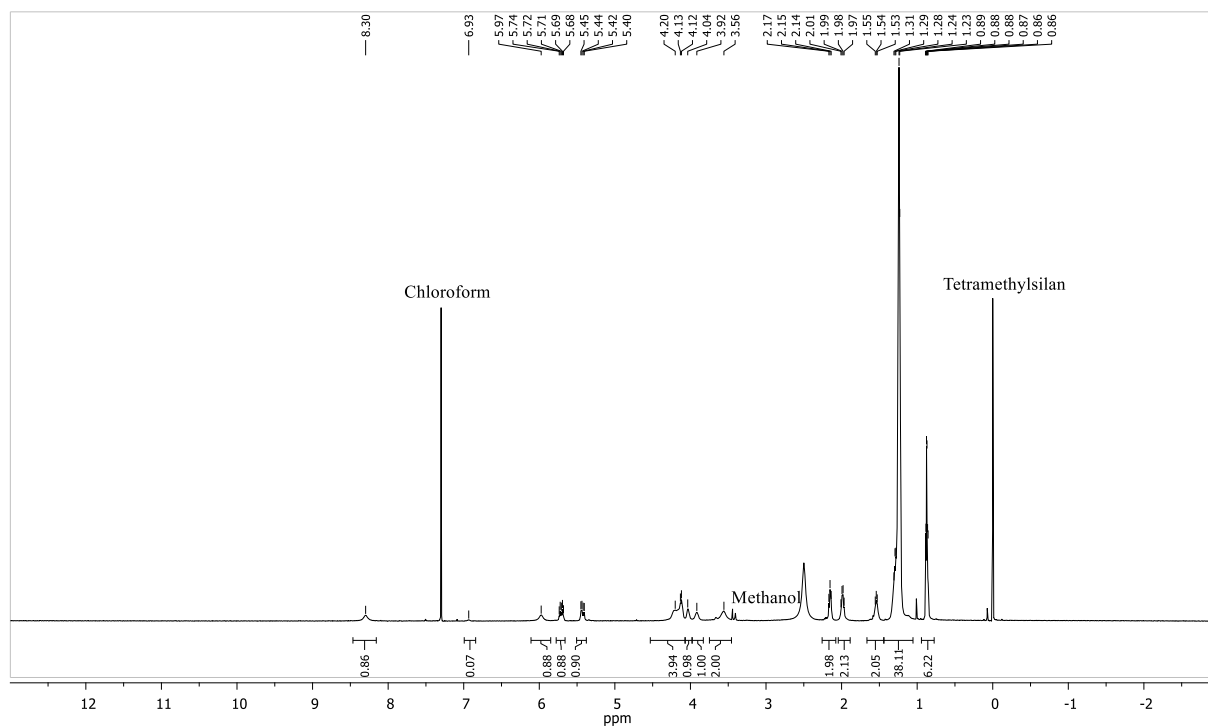
Abb. 9-17 | Vergleich mikroskopischer Aufnahmen eines Gemisches von WT- und ASM-KO-MEFs nach 72 h Inkubation mit 2.5  $\mu\text{M}$  BSA-komplexierter Sonde **2** | von links nach rechts: NBD nach Anregung bei 488 nm, Lysotracker DeepRed nach Anregung bei 635 nm, DIC, Überlagerung der Bilder von NBD (grün) und Lysotracker DeepRed (rot). Gelbe Bildpunkte zeigen Kokalisation an. Getrennte Aufnahmen von isolierten WT- und KO-MEFs siehe Abb. 3-48. Der rote Balken entspricht 50  $\mu\text{m}$ .

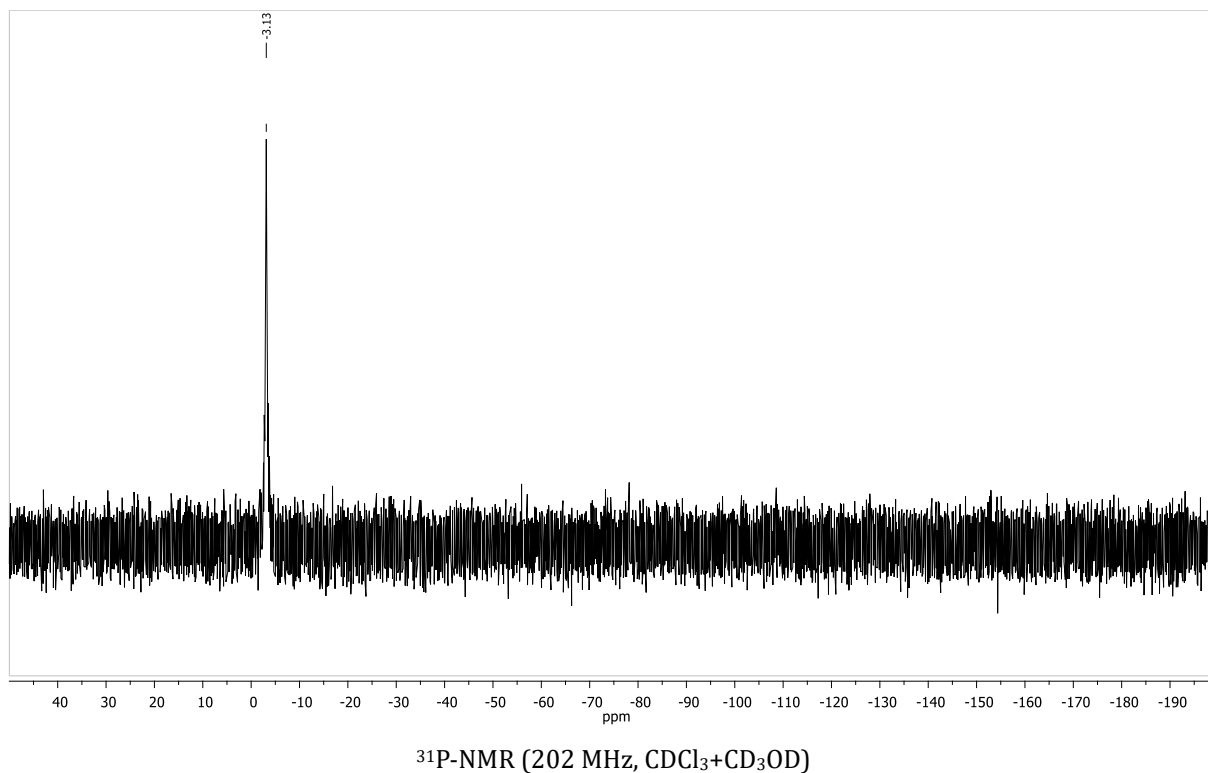
## 9-5 | Kristallographische Daten & Messparameter

### 4-{2-[(2-Hydroxyethyl)(methyl)amino]ethylamino}-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 13

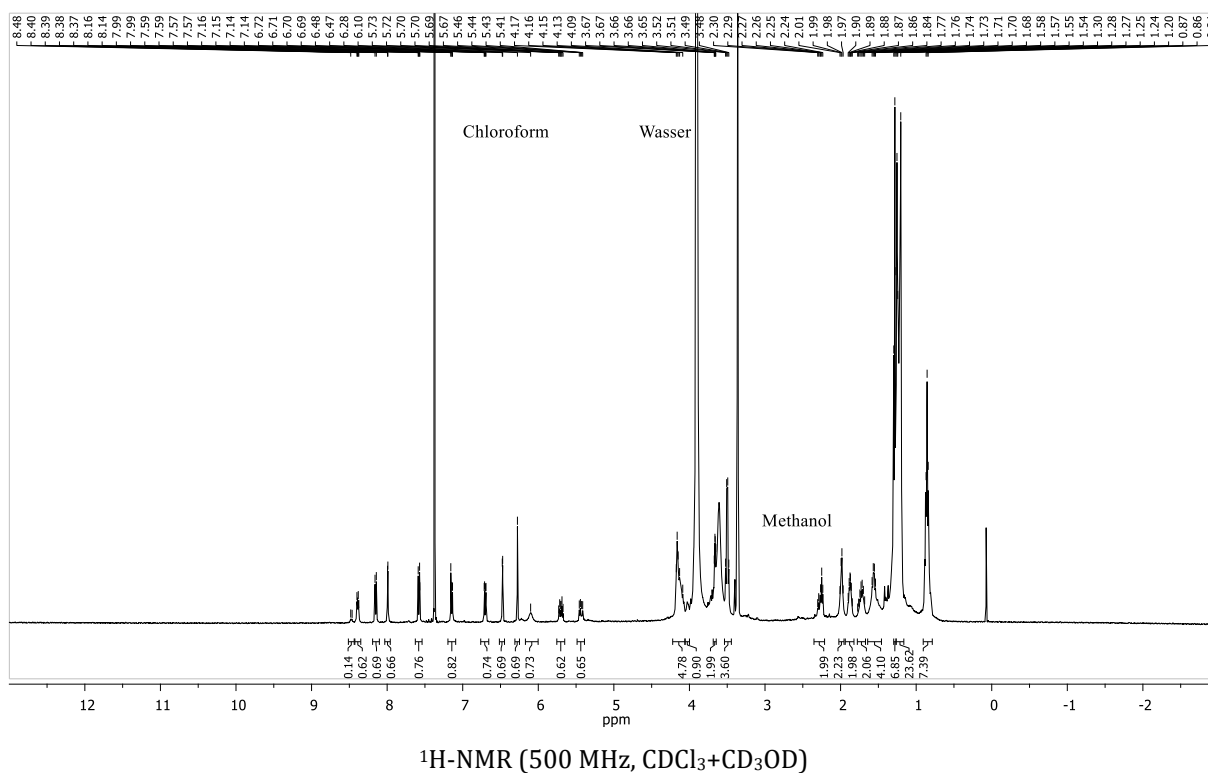
Empirische Formel	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>4</sub>
Molekulare Masse	281.28
Kristall Form, Farbe	Nadeln, braun
Kristall dim. (mm)	0.46 x 0.18 x 0.16
Kristallsystem	Monoklin
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> /c
a[Å]	11.6543(9)
b[Å]	13.0180(10)
c[Å]	8.5269(7)
α[°]	90
β[°]	90.876(6)
γ[°]	90
V [Å <sup>3</sup> ]	1293.51(18)
Z	4
D [g cm <sup>-3</sup> ]	1.444
F(000)	592
μ(Mo-Kα) [cm <sup>-1</sup> ]	0.113
θ <sub>range</sub>	4.70 – 25.23
registrierte Reflexe	2288
unabhängige Reflexe	2288
R <sub>int</sub>	0.0000
Parameters refined	183
R <sub>1</sub>	0.1153
wR <sub>2</sub>	0.3202
GooF	1.151
Diff. peak/ hole [e/Å <sup>3</sup> ]	-.55/.50
CCDC Nummer	nicht vergeben

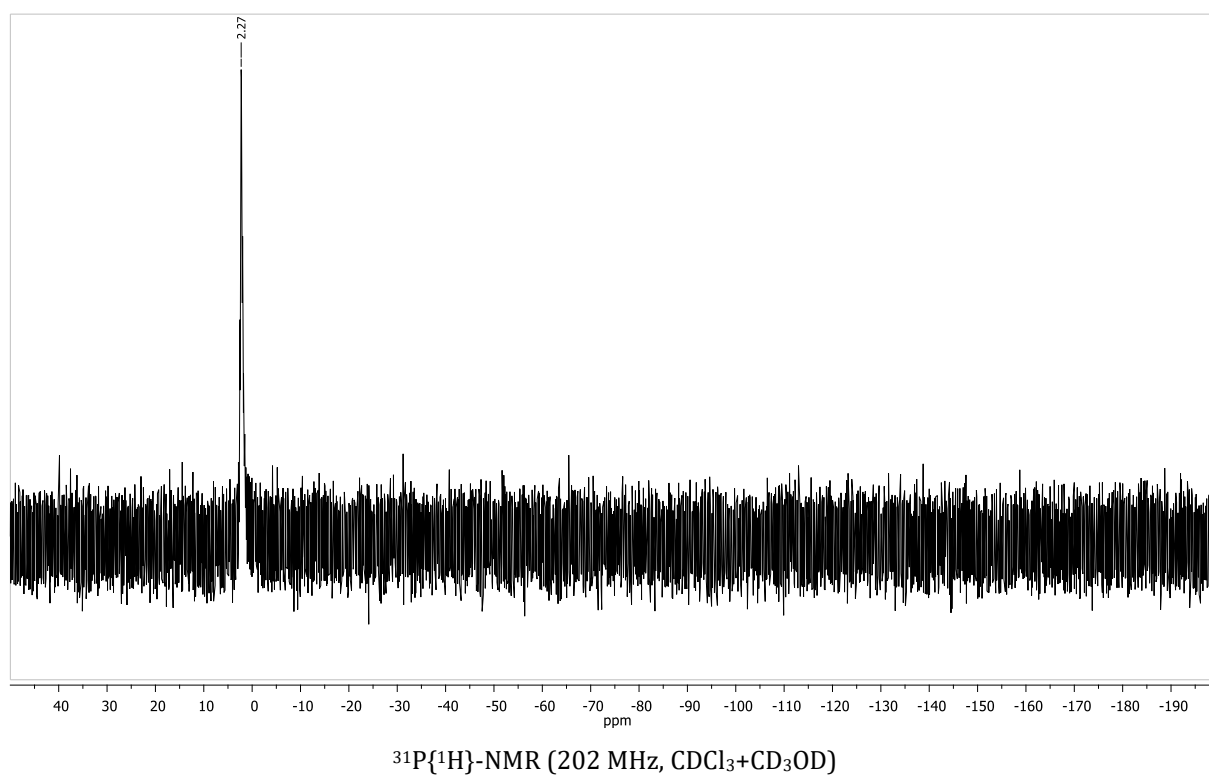
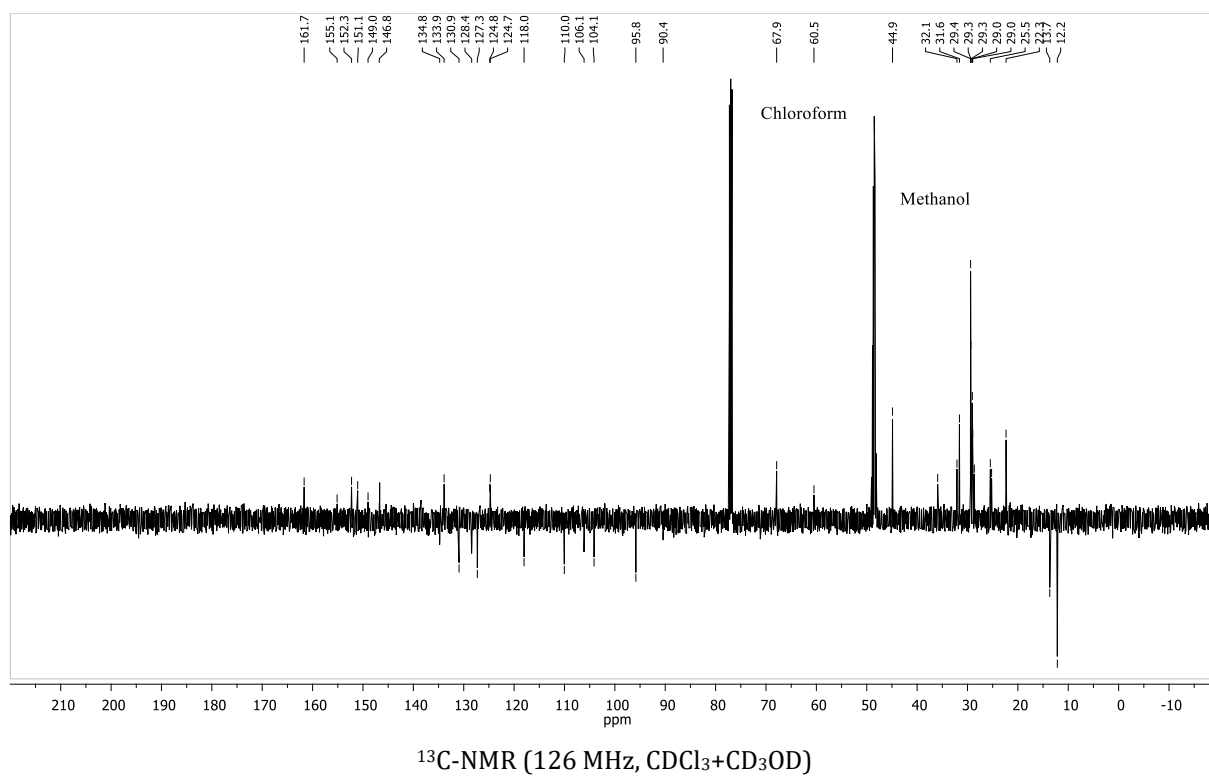
## 9-6 | NMR-Spektren

4-[[*(2S,3R,E)*-2-(Dodecanoylamino)-3-hydroxyoctadec-4-en-1-phosphoethyl-amino]-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 0



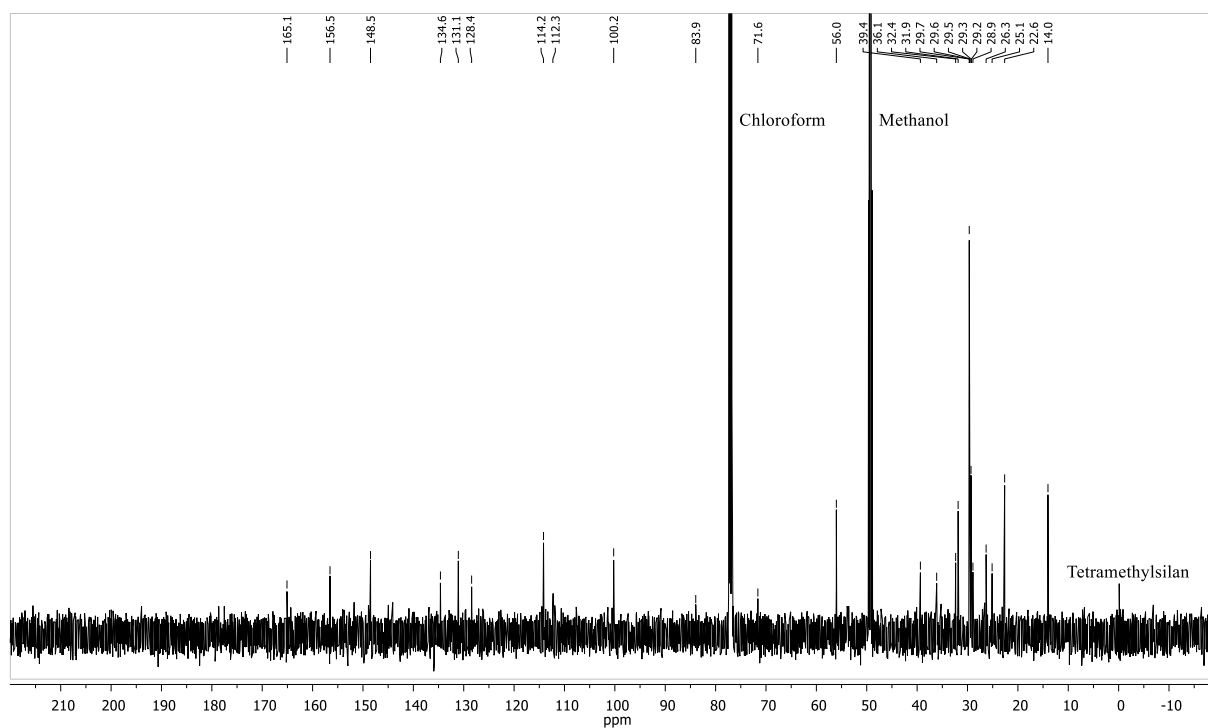
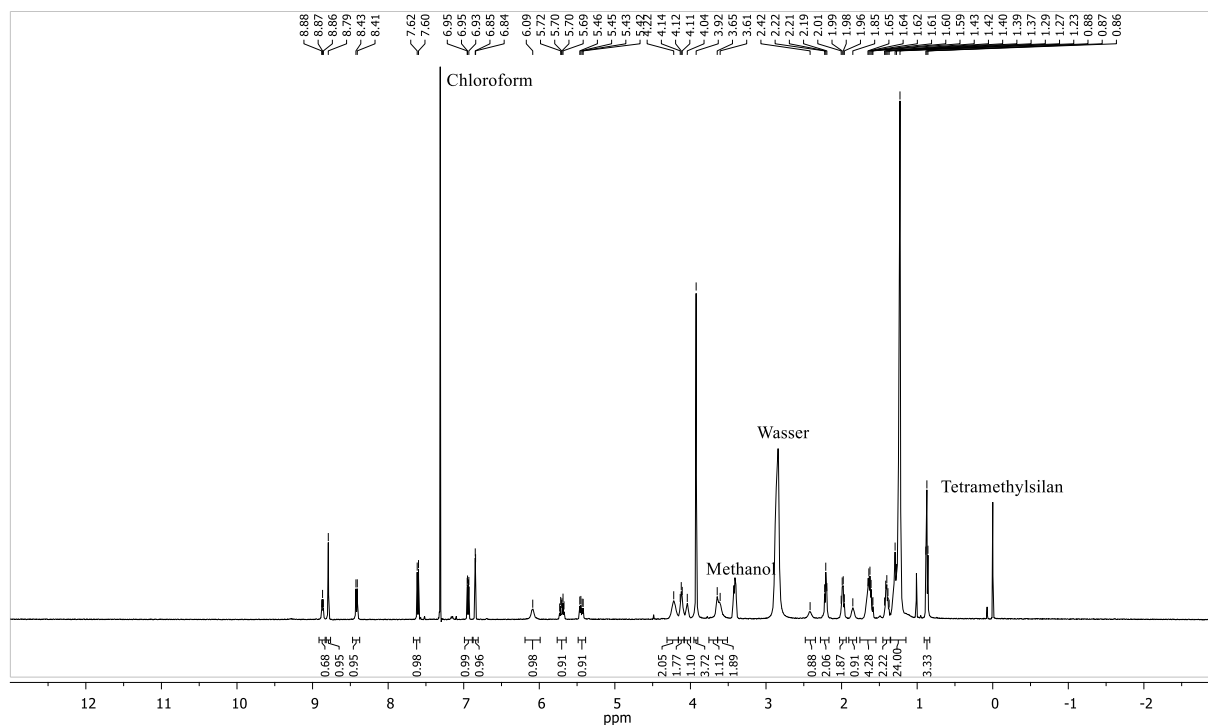
**4-[(2*S*,3*R*,*E*)-2-(6-(9-Diethylamino-5-oxo-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-2-yloxy)-hexanoylamino)-3-hydroxyoctadec-4-en-1-phosphoethylamino]-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 1**

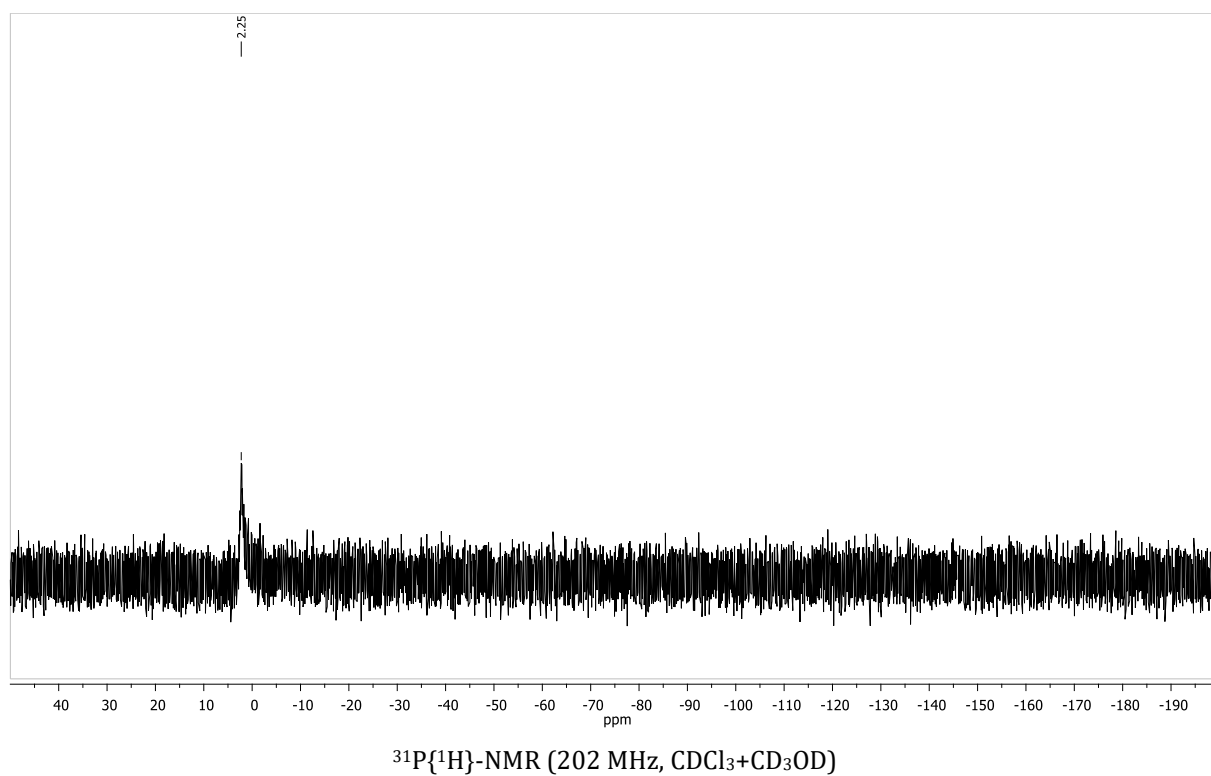




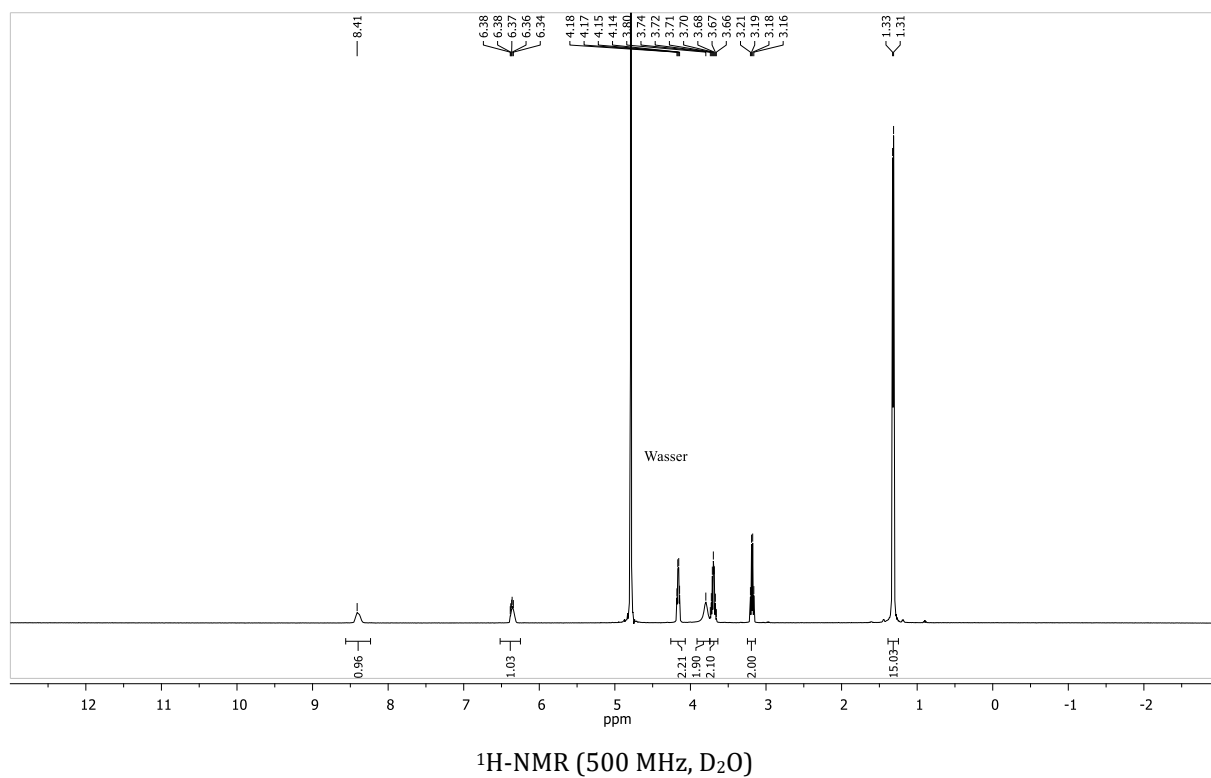


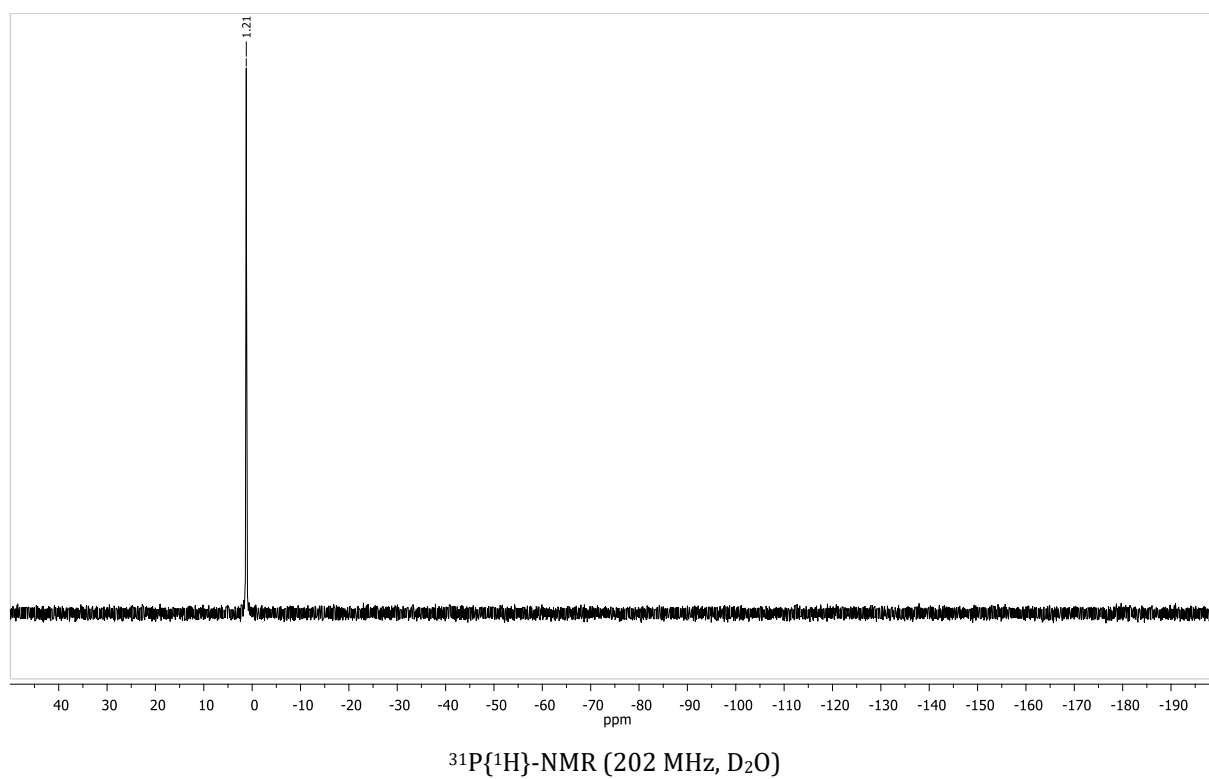
**4-[(2*S*,3*R*,*E*)-2-(6-(7-Methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-carboxamido)hexanoyl-amino)-3-hydroxyoctadec-4-en-1-phosphoethylamino]-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 2**



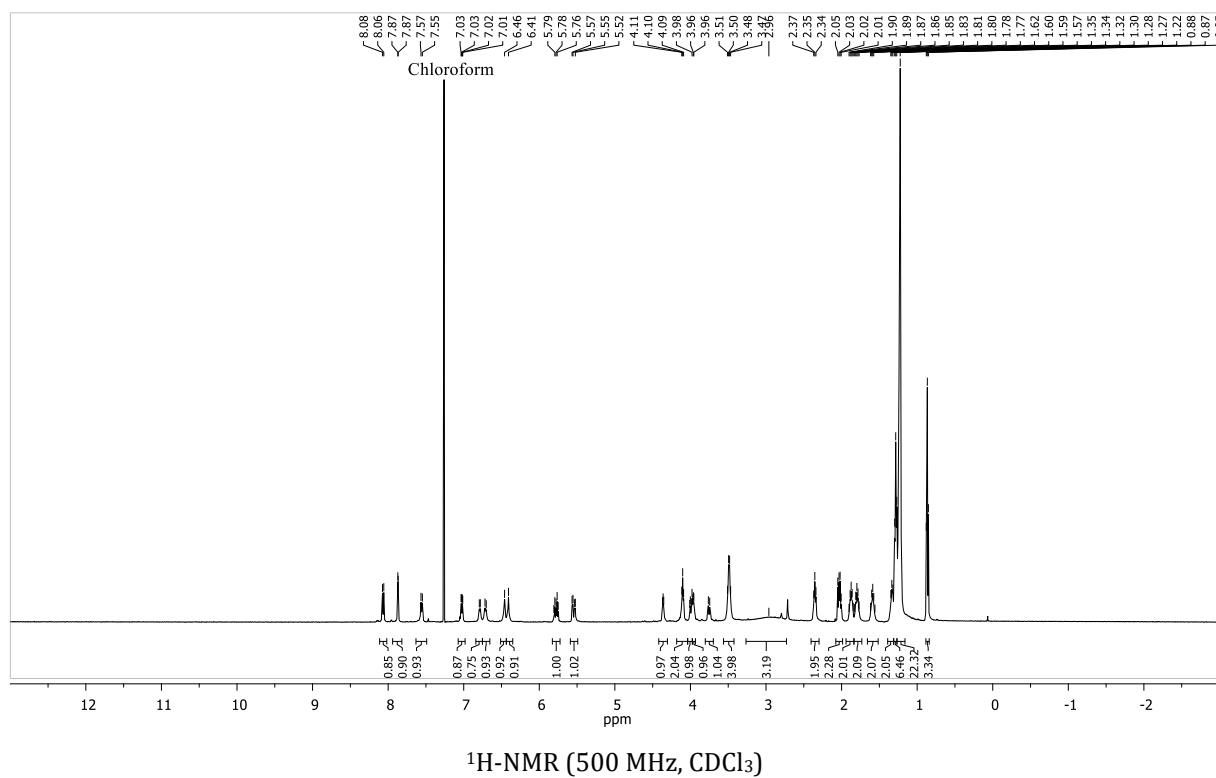


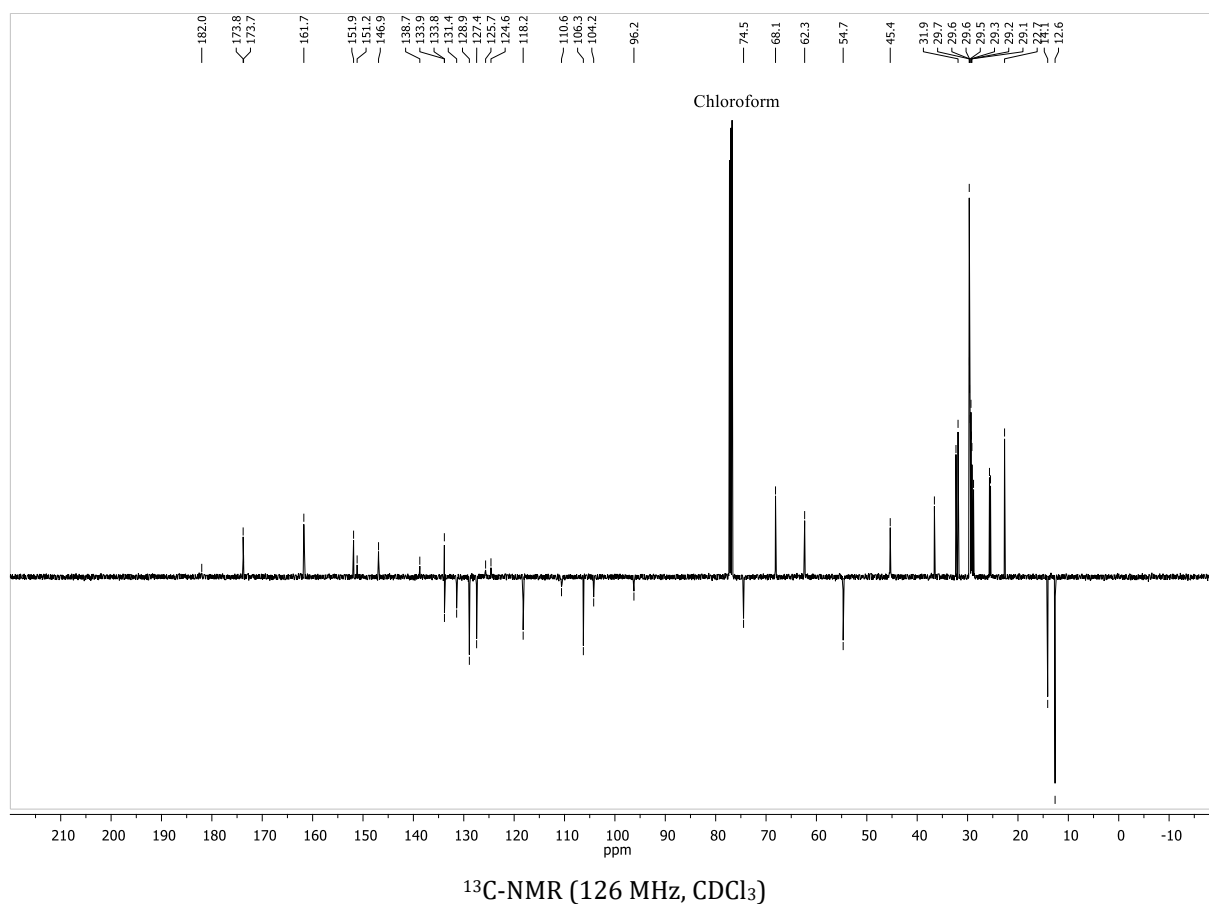
***N,N*-Diisopropyl-*N*-ethylammonium-2-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino)-ethylphosphat 3**



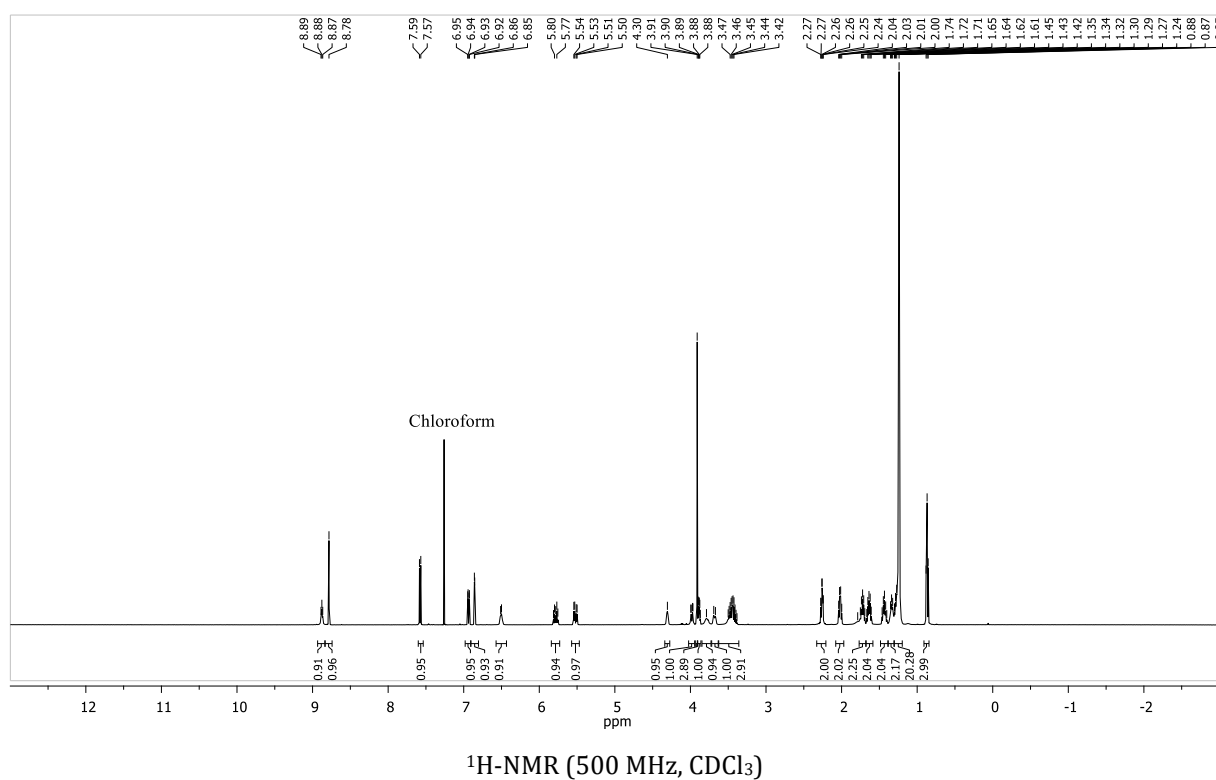


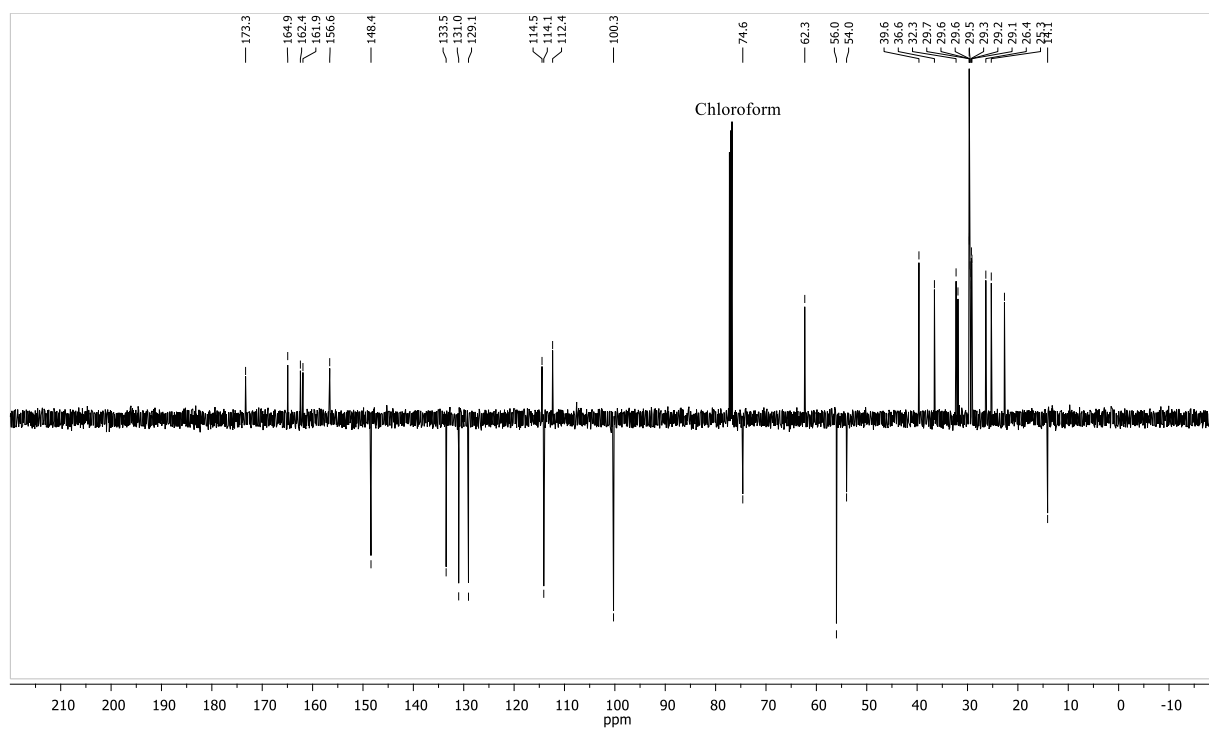
**6-[9-(Diethylamino)-5-oxo-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-2-yloxy]-*N*-[(2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-yl]hexanamid (NR-Cer) 4**





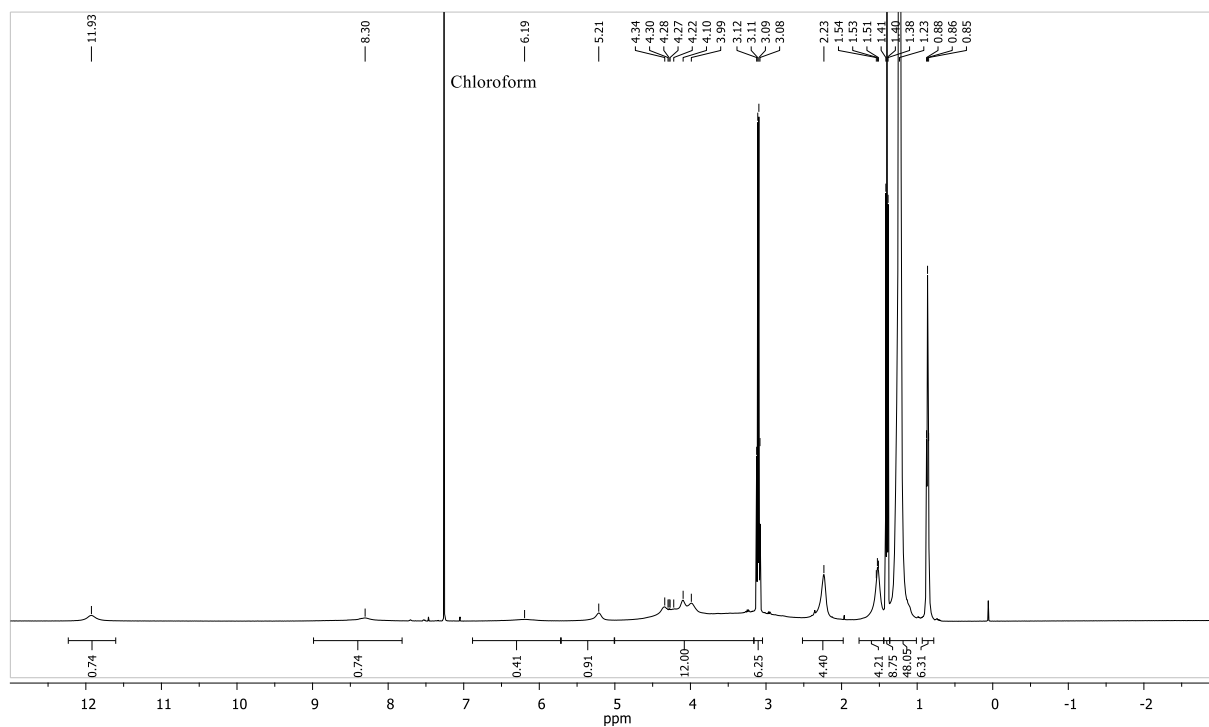
***N*-{6-[(2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxyoctadec-4-en-2-ylamino]-6-oxohexyl}-7-methoxy-2-oxo-2*H*-chromen-3-carboxamid (MCC-Cer) 5**



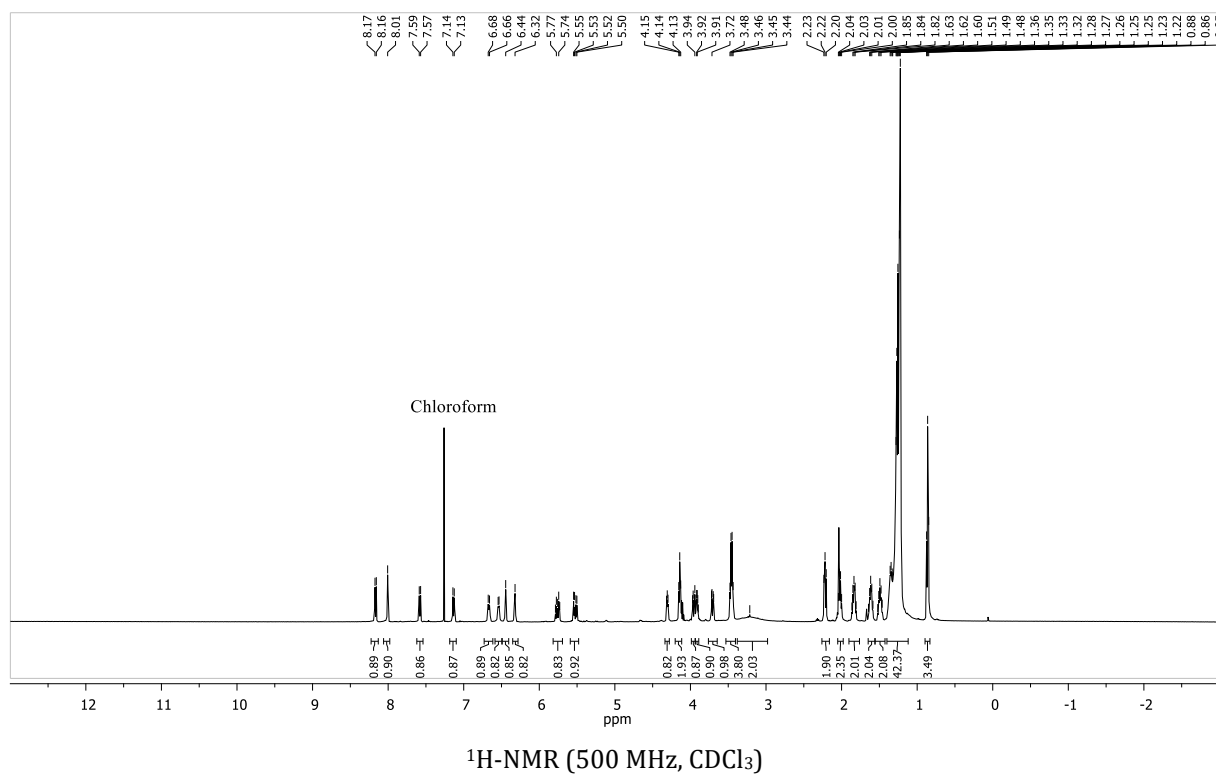
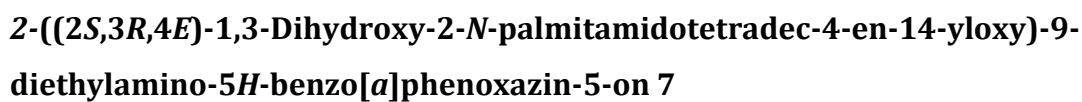


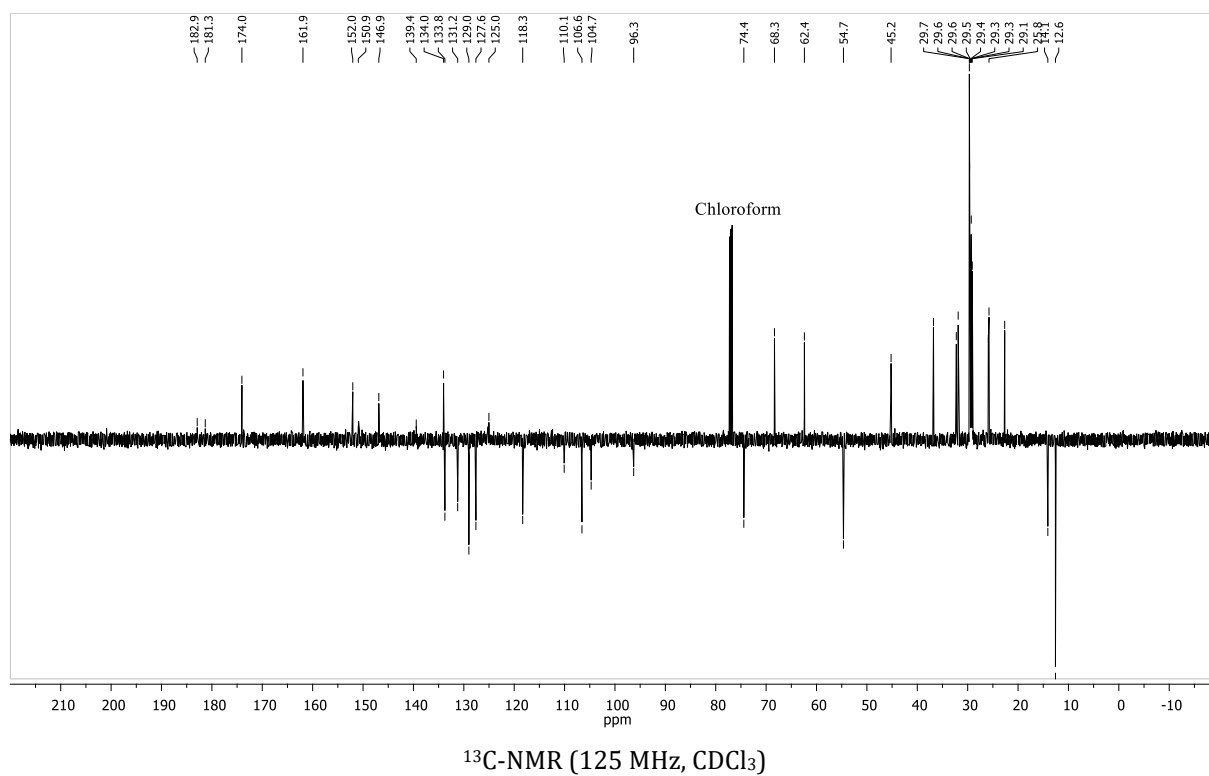
<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

**Triethylammonium-(*R*)-2,3-bis(hexadecanoyloxy)propyl-2-(methyl[2-(7-nitro-benzo-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino)ethyl]amino)ethylphosphat 6**

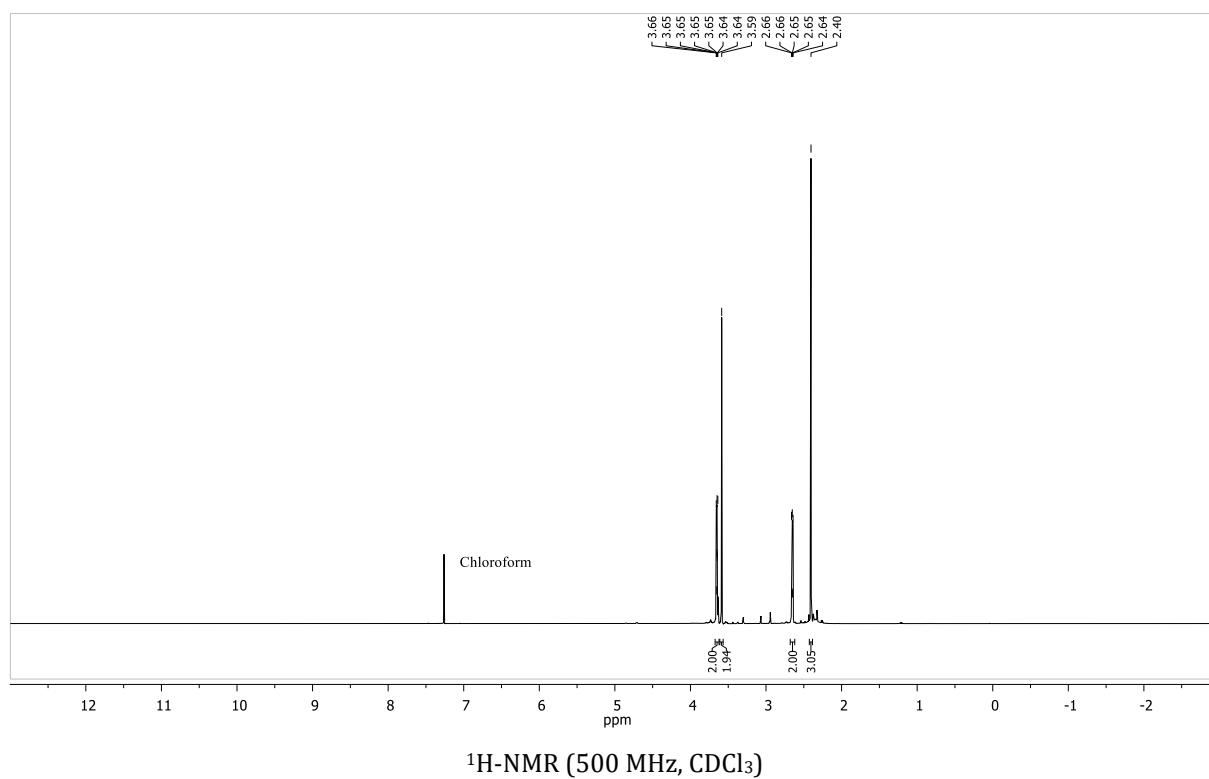


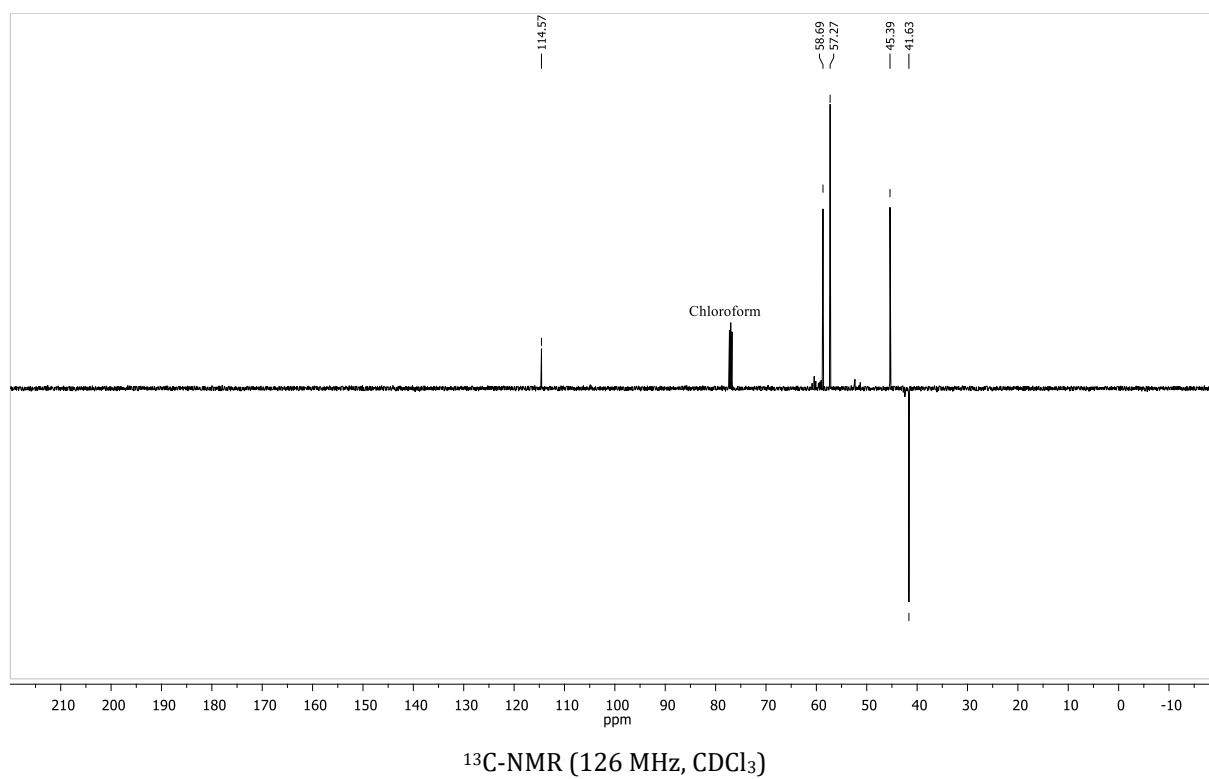
<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



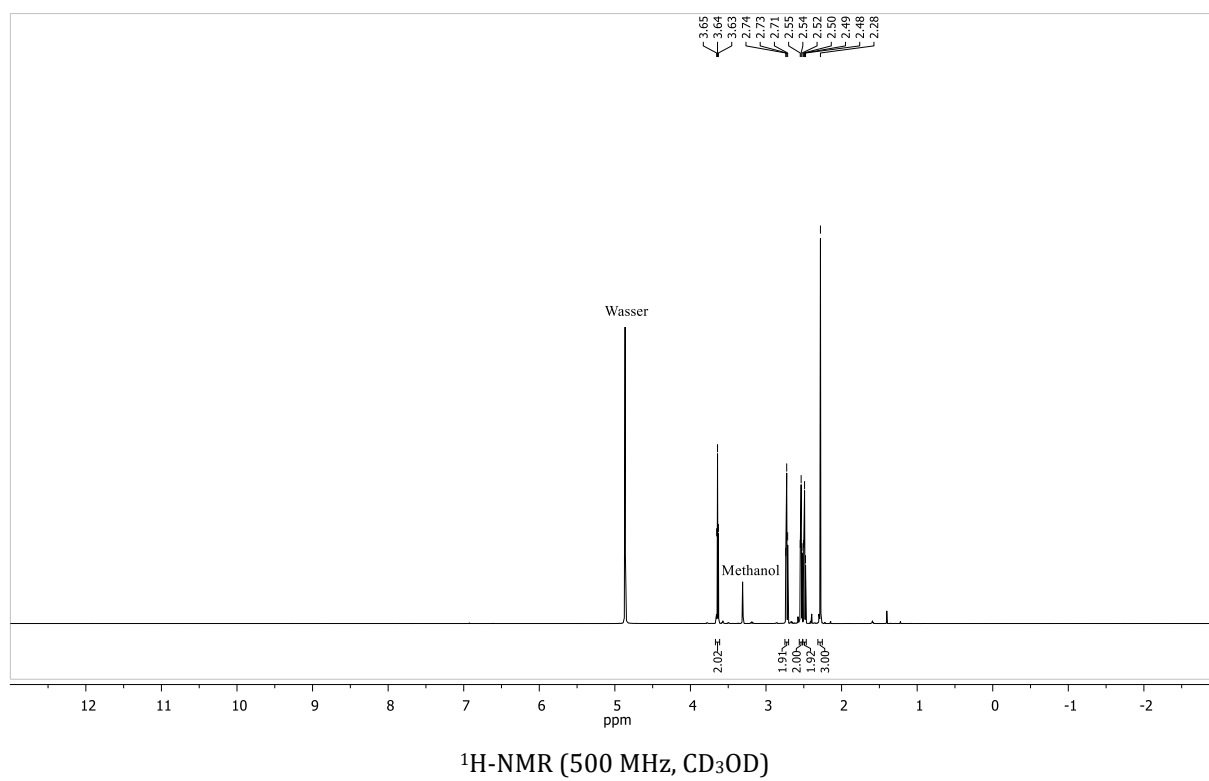


## 2-((2-Hydroxyethyl)(methyl)amino)acetonitril 10

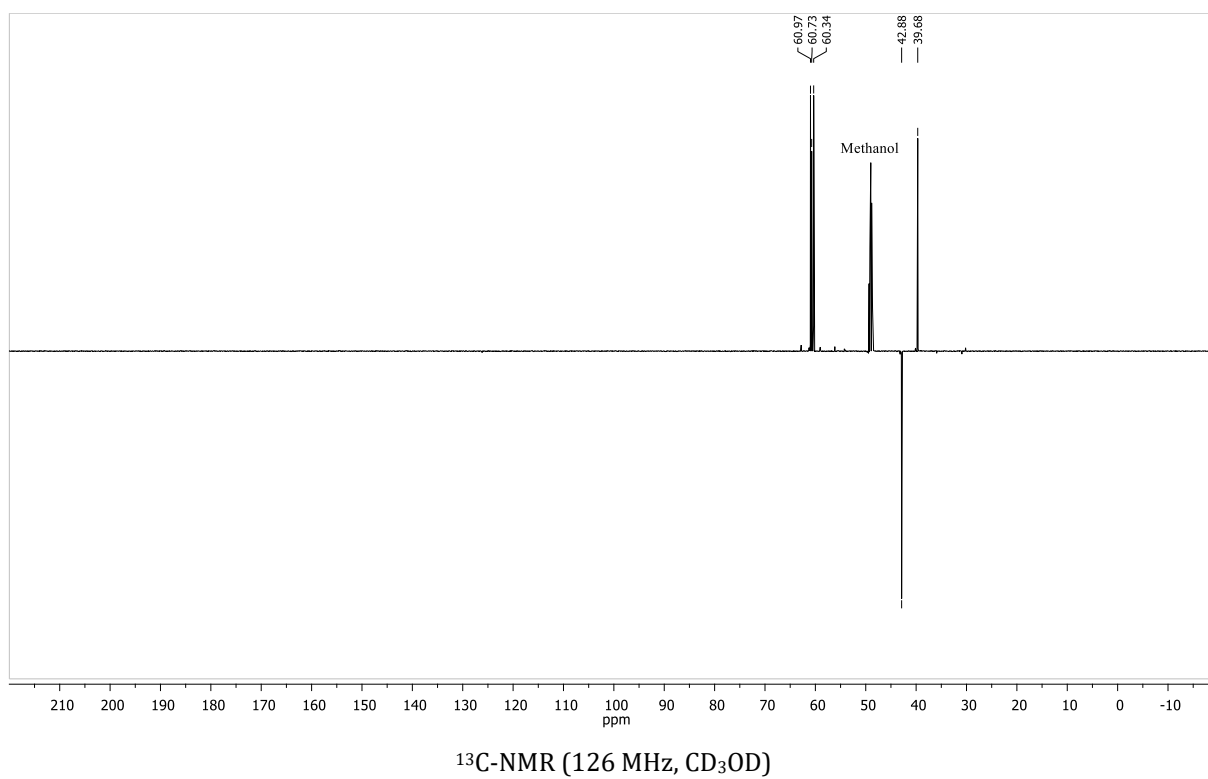
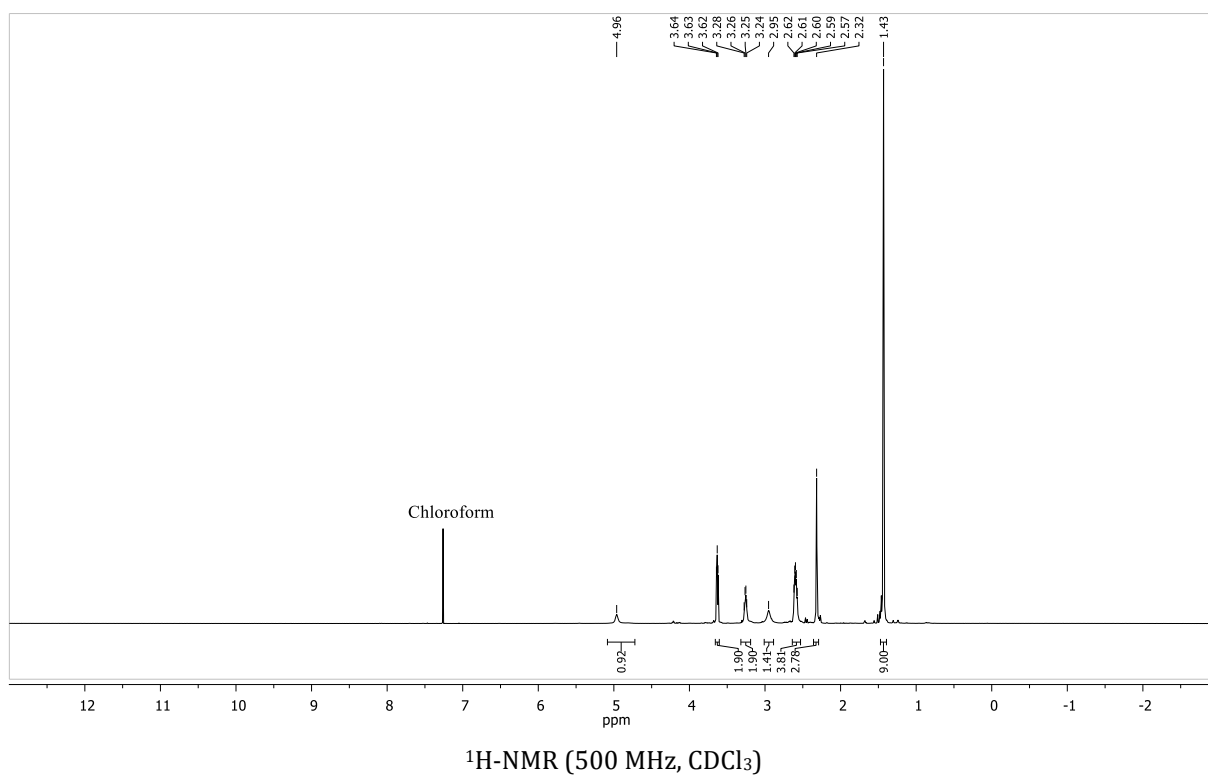


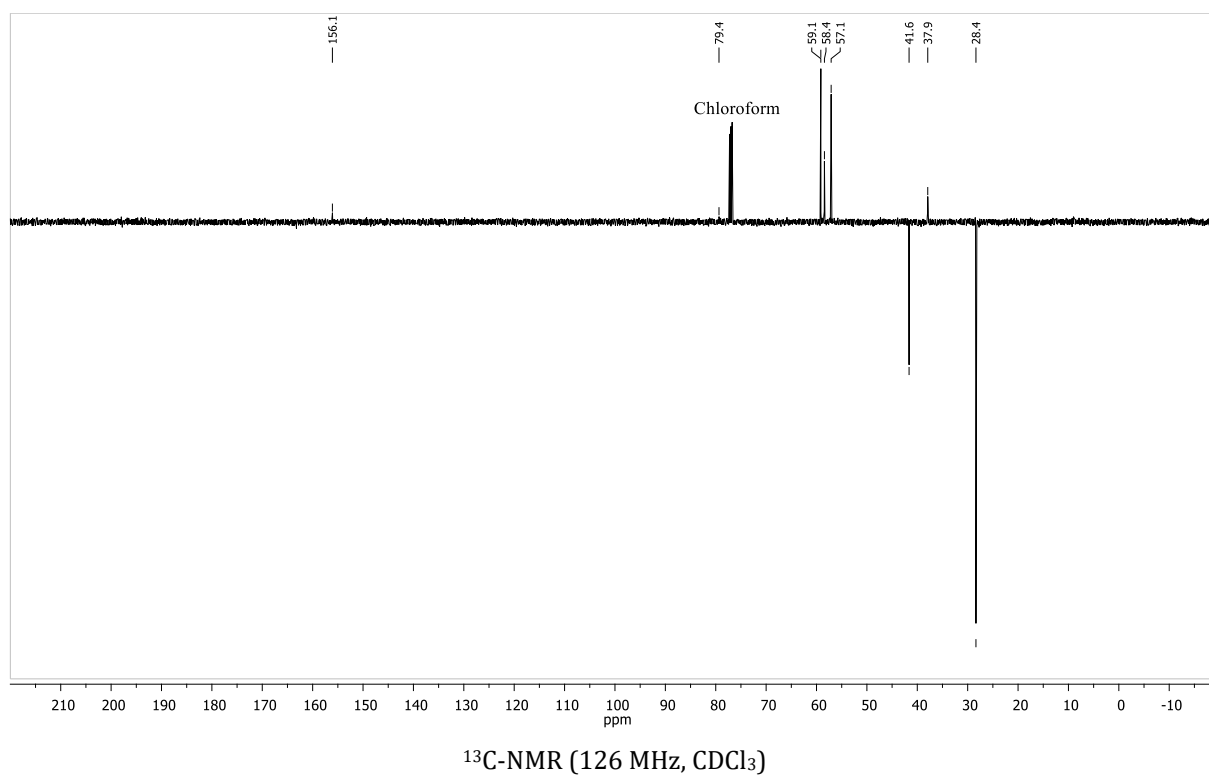


### 2-[(2-Aminoethyl)(methyl)amino]ethanol 11

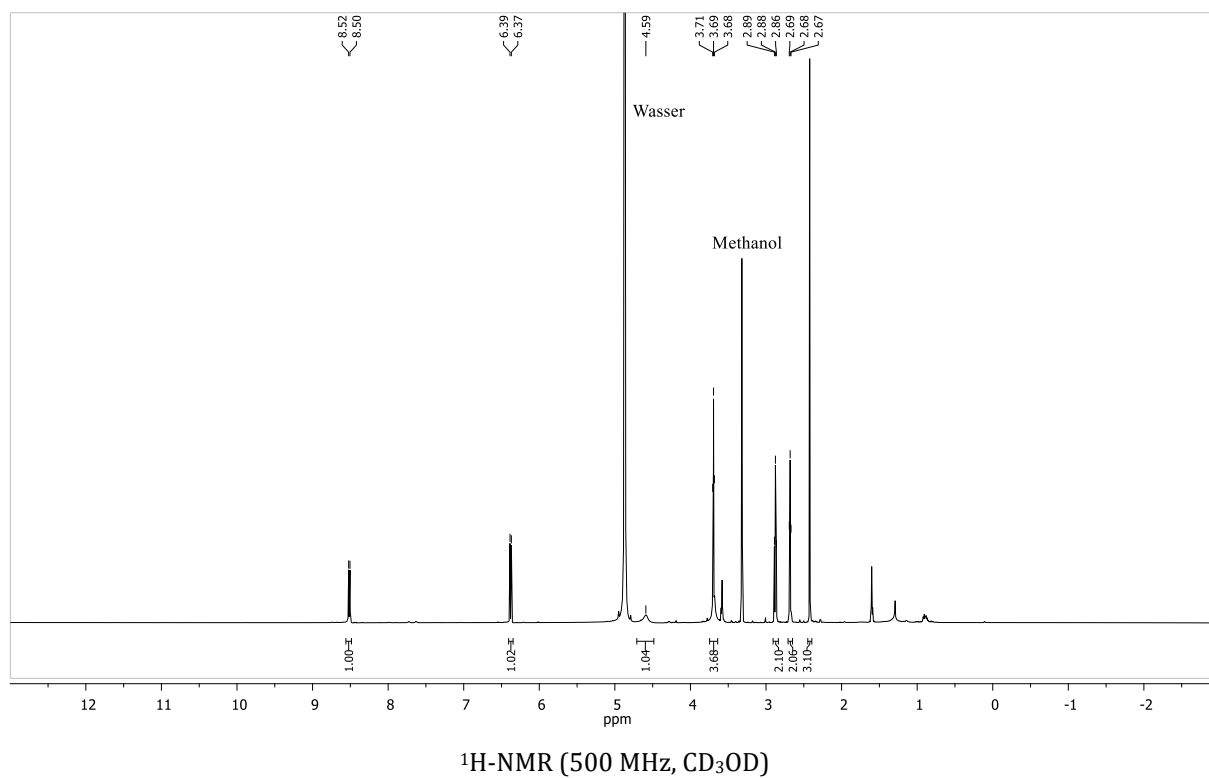


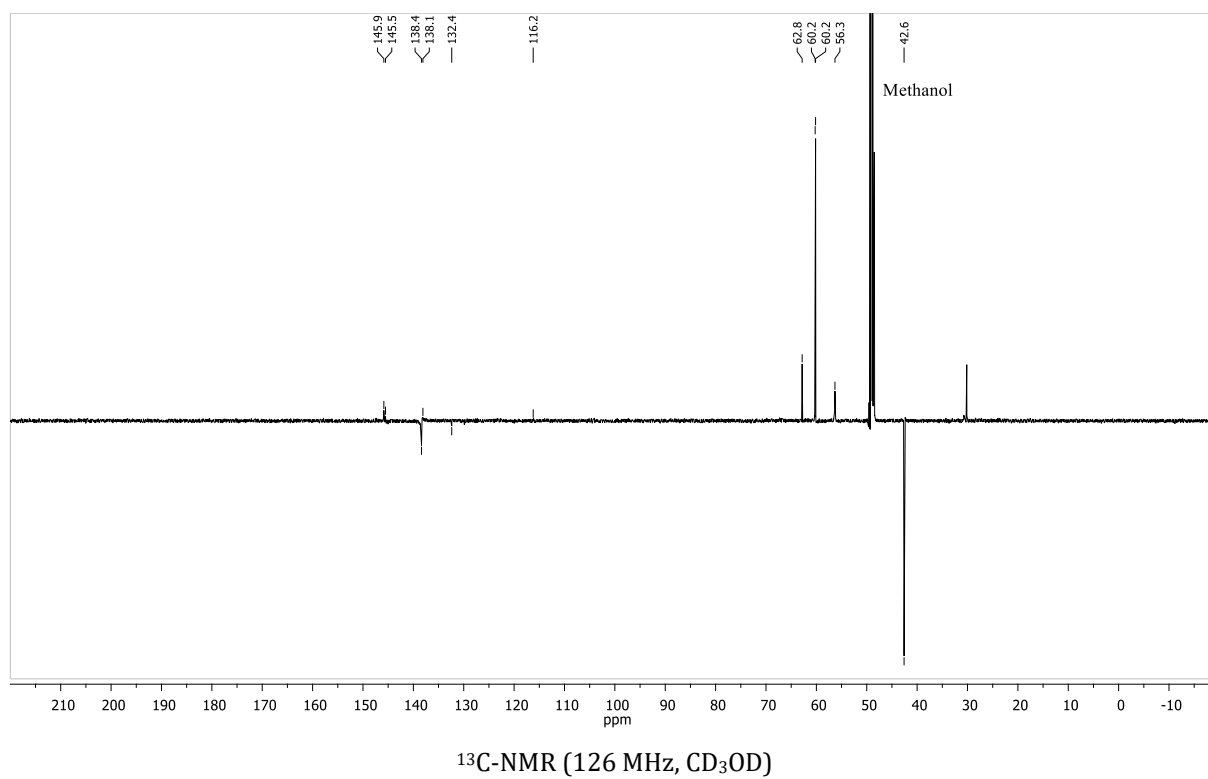


**2-[(2-Hydroxyethyl)(methyl)amino]ethylcarbaminsäure-*tert*-butylester 12**

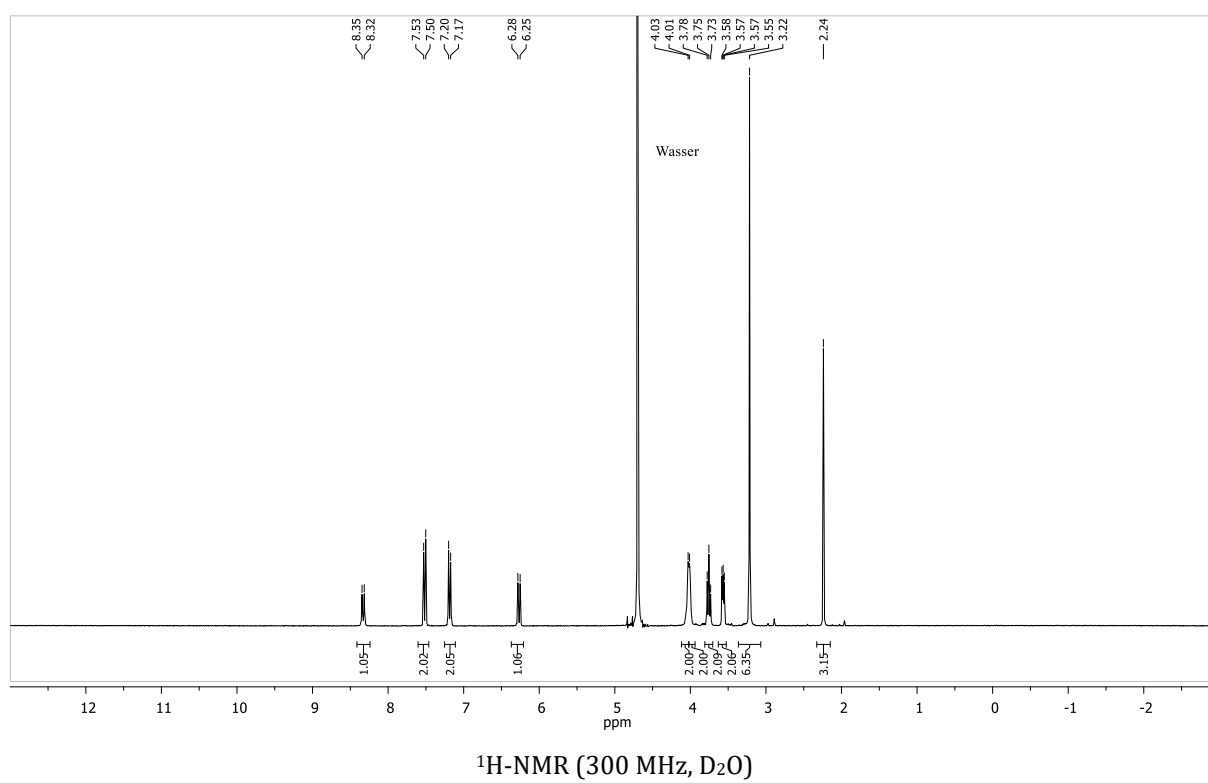


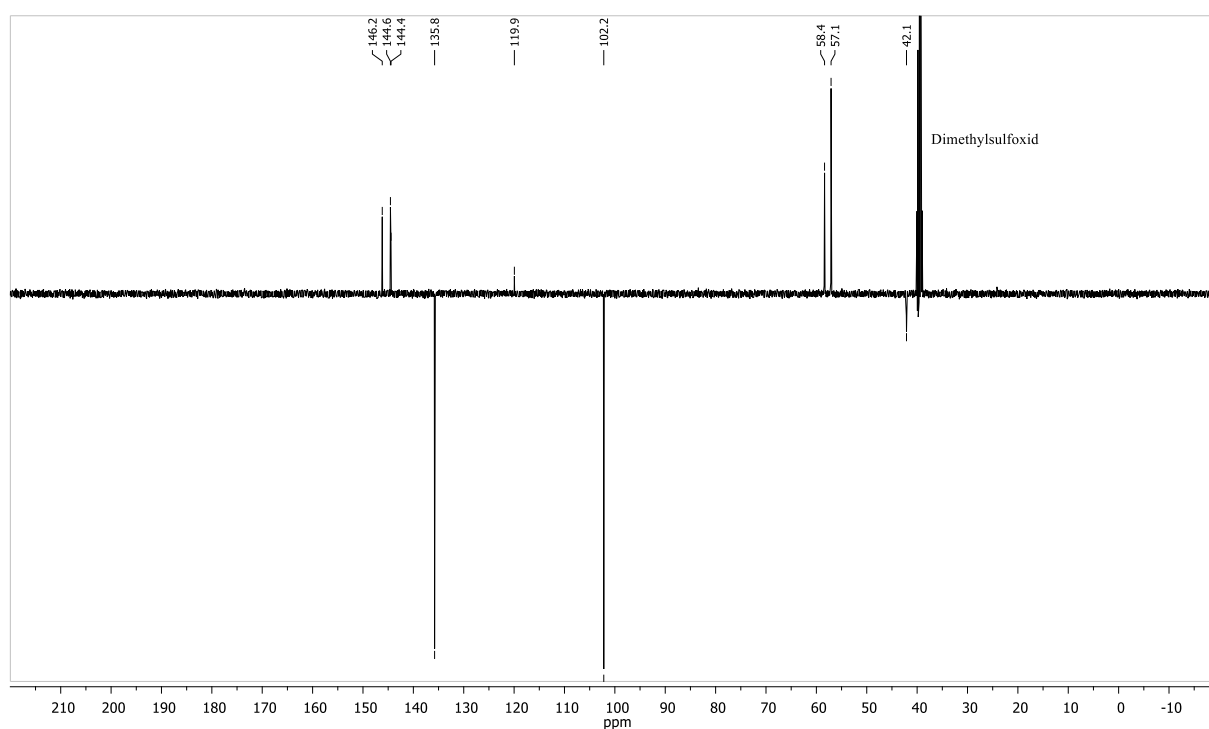
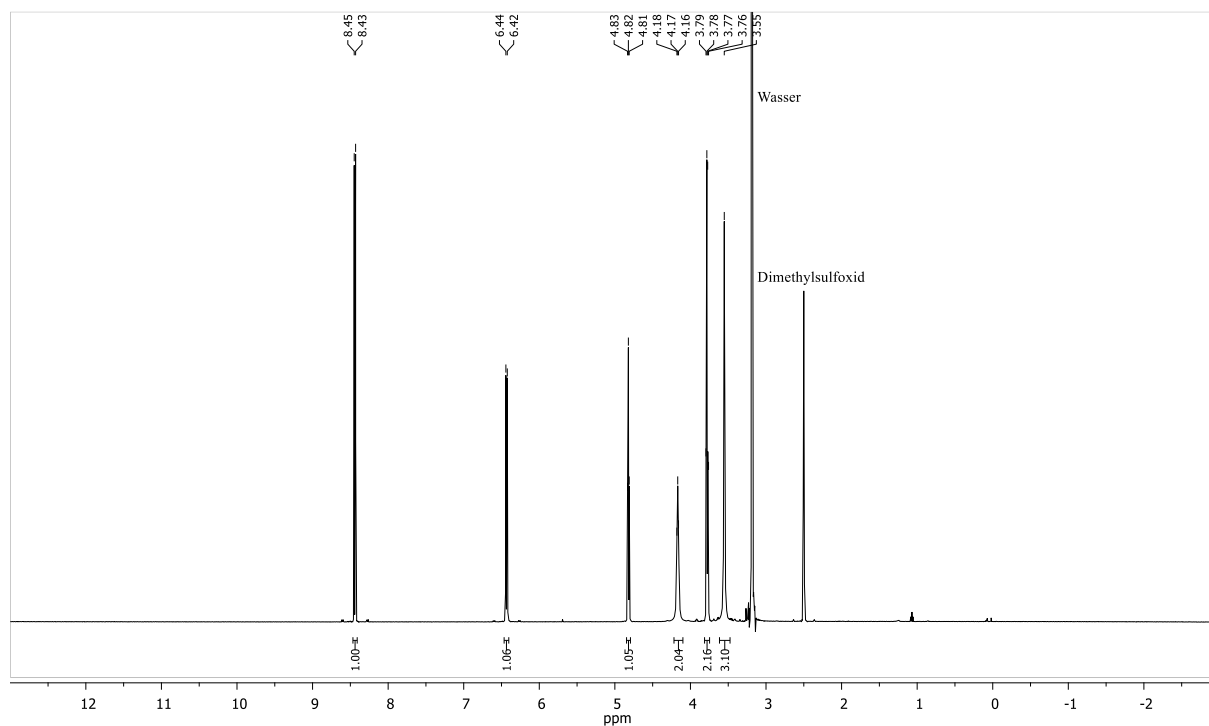
**4-{2-[(2-Hydroxyethyl)(methyl)amino]ethylamino}-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 13**



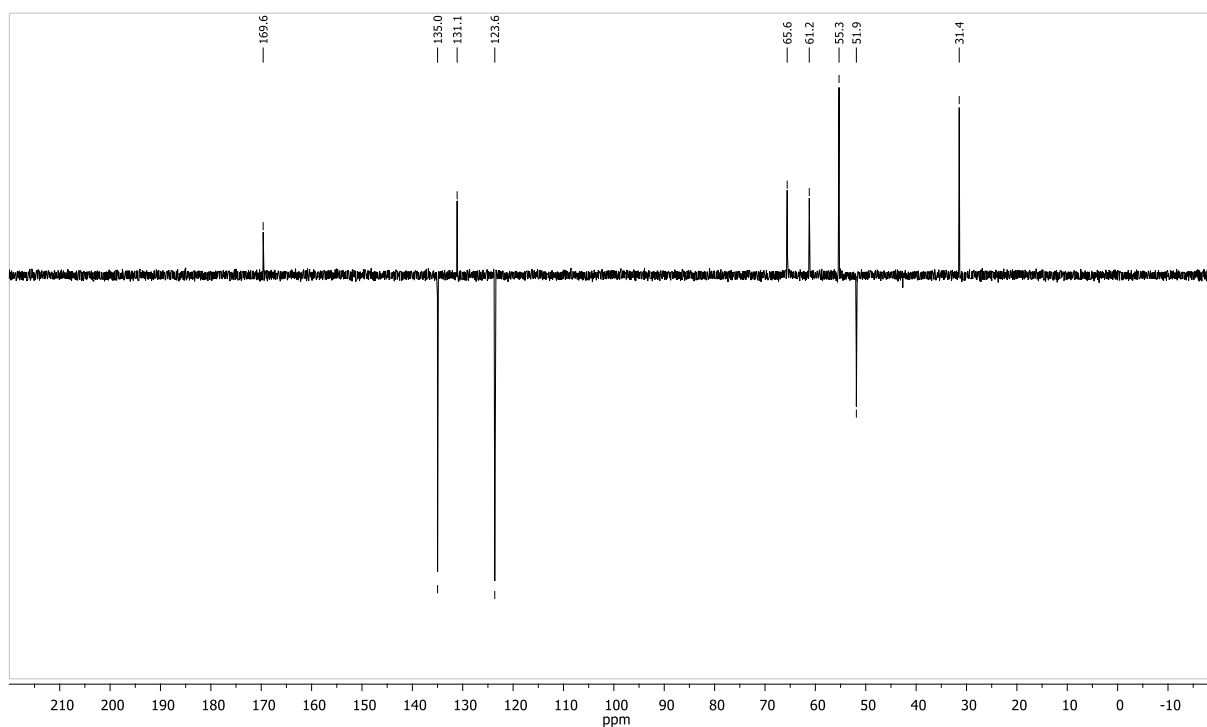
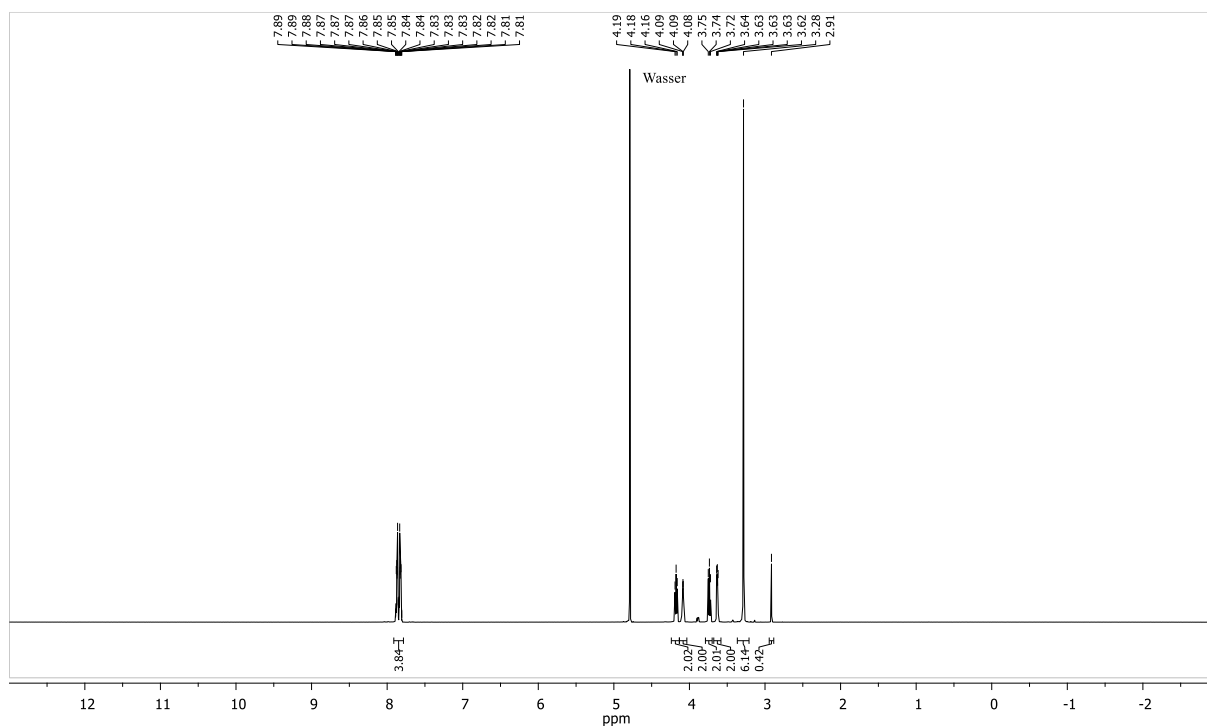


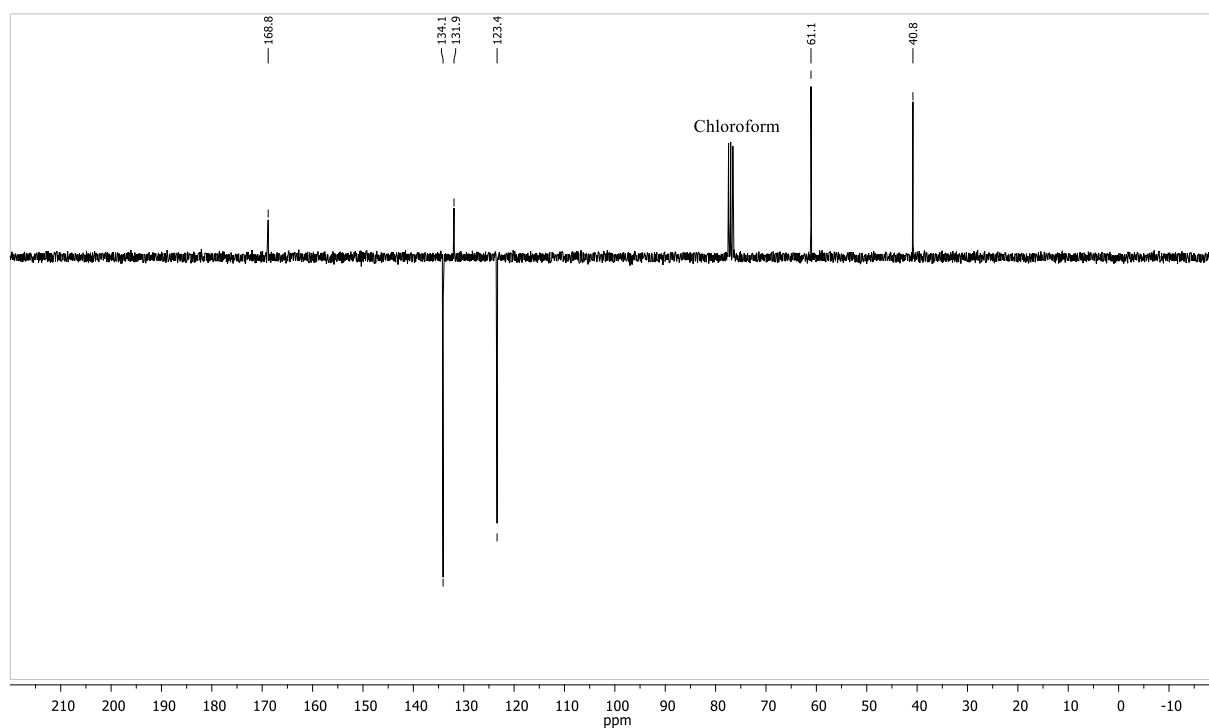
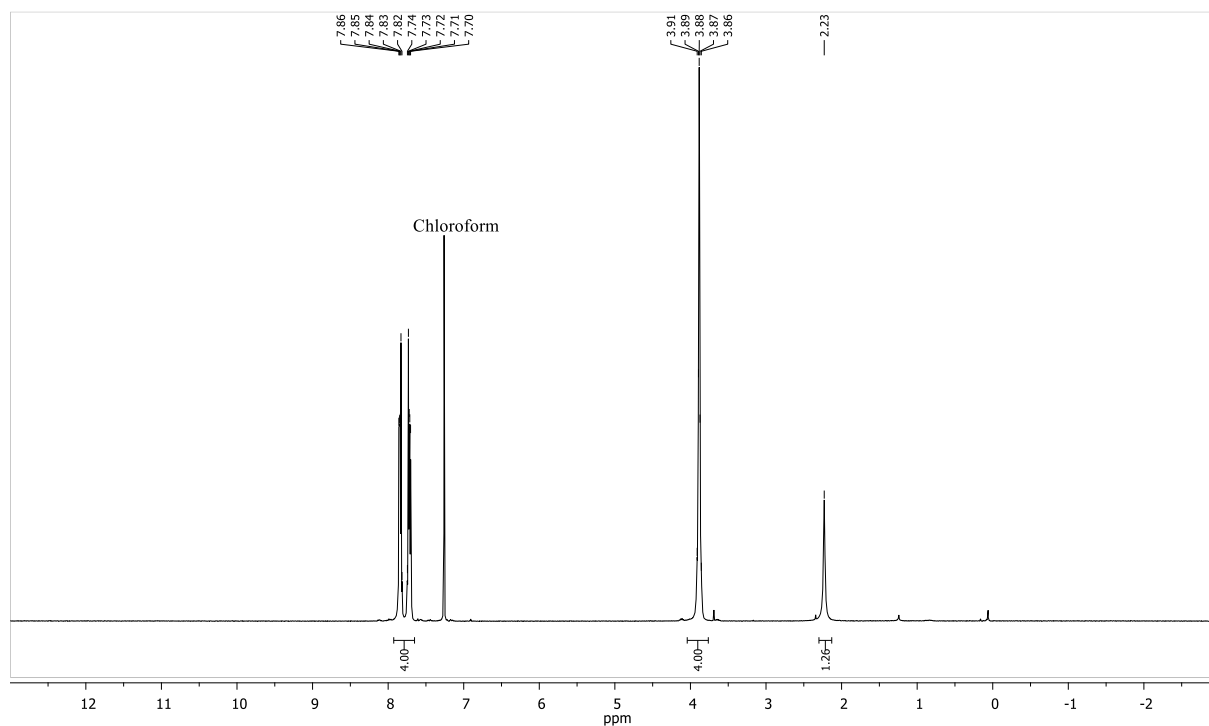
***N*-(2-Hydroxyethyl)-*N*-[2-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-ylamino)ethyl]-*N,N*-dimethylammonium-*para*-toluensulfonat 14**

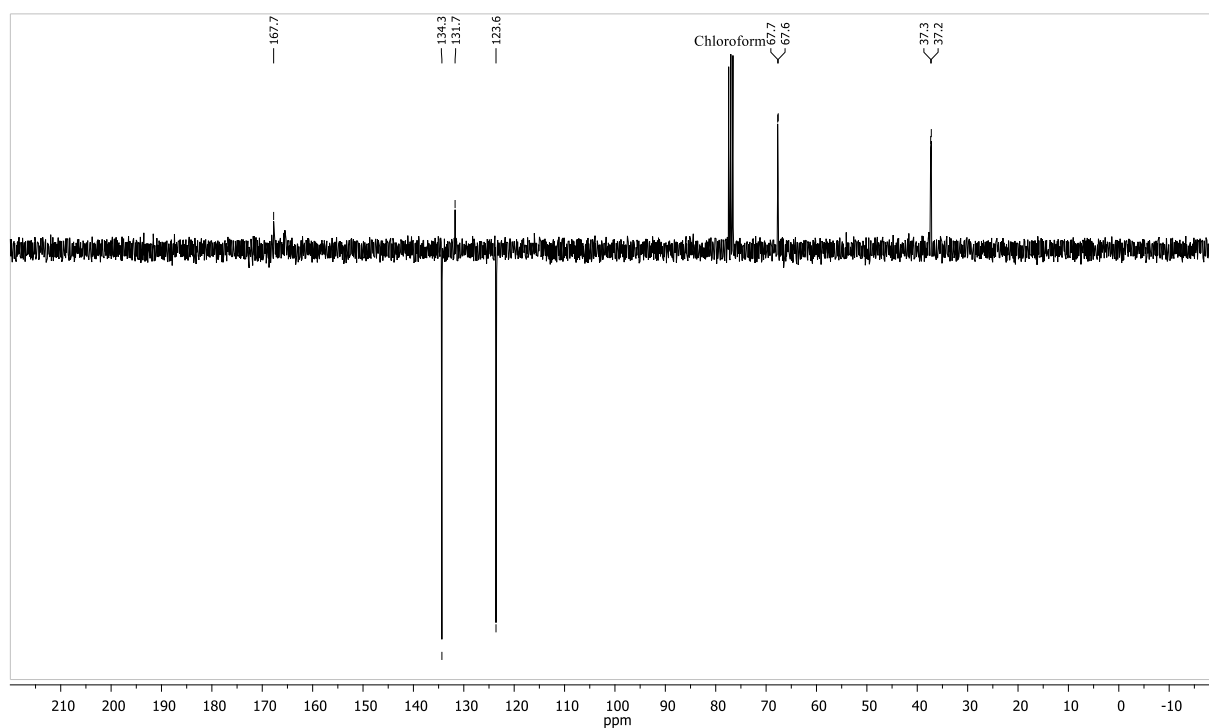
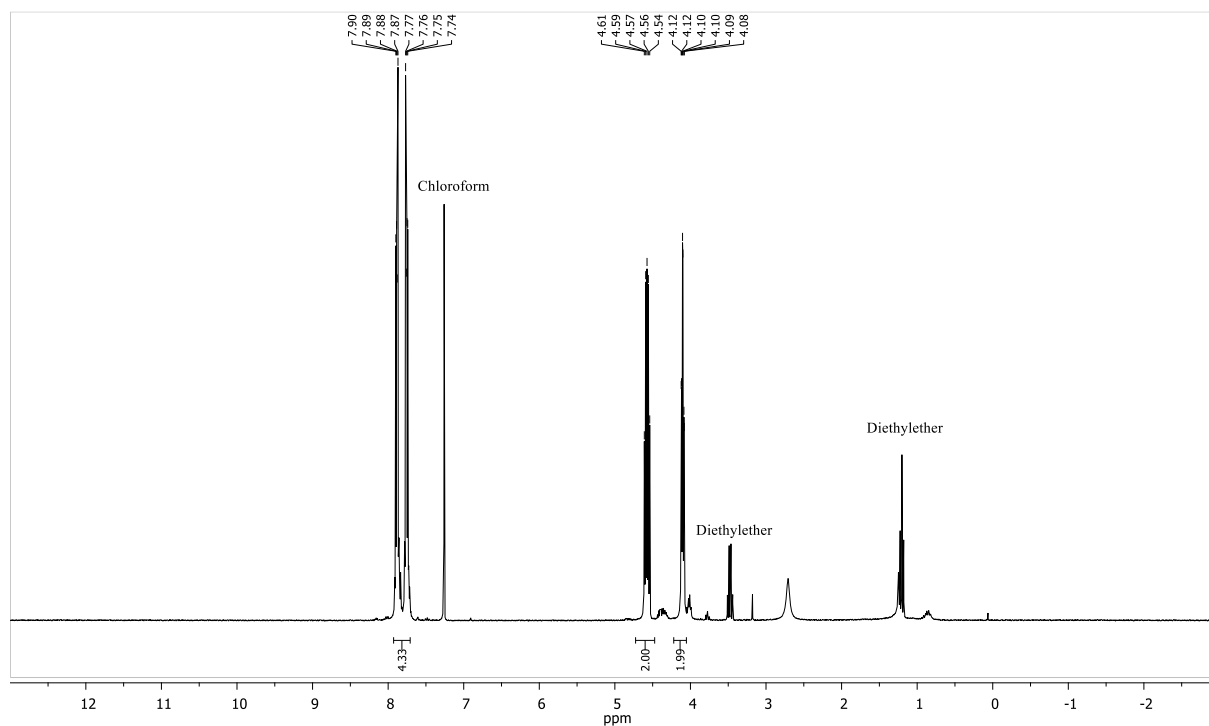


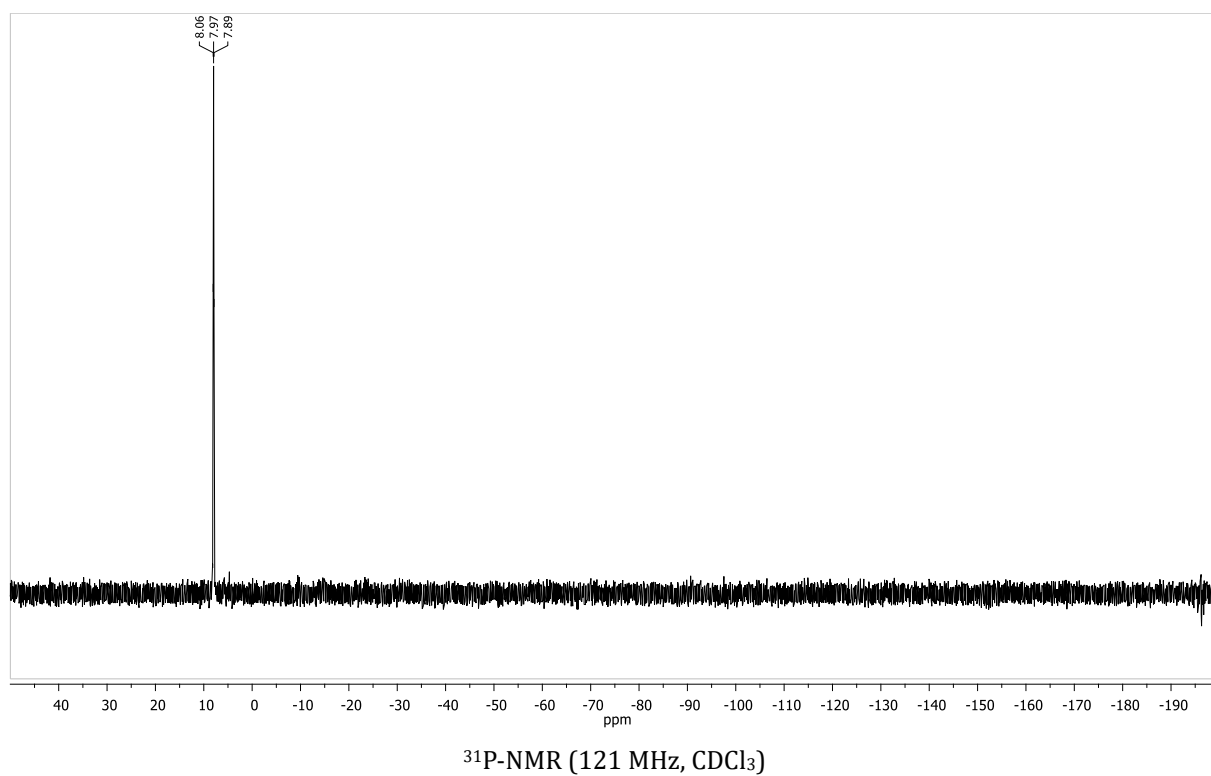
**2-[Methyl-(7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]ethanol 15**

***N*-[2-(1,3-Dioxoisindolin-2-yl)ethyl]-*N*-(2-hydroxyethyl)-*N,N*-dimethylammoniumbromid 16**

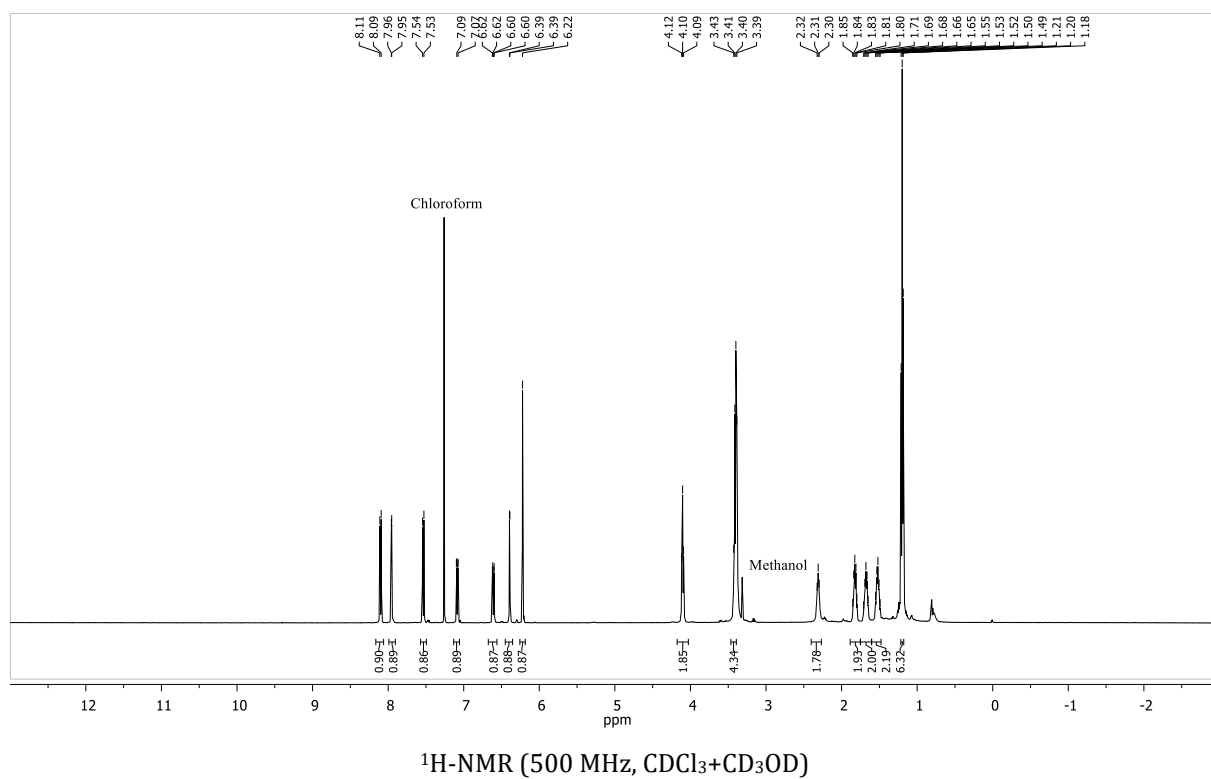


**2-(2-Hydroxyethyl)isoindolin-1,3-dion 17**

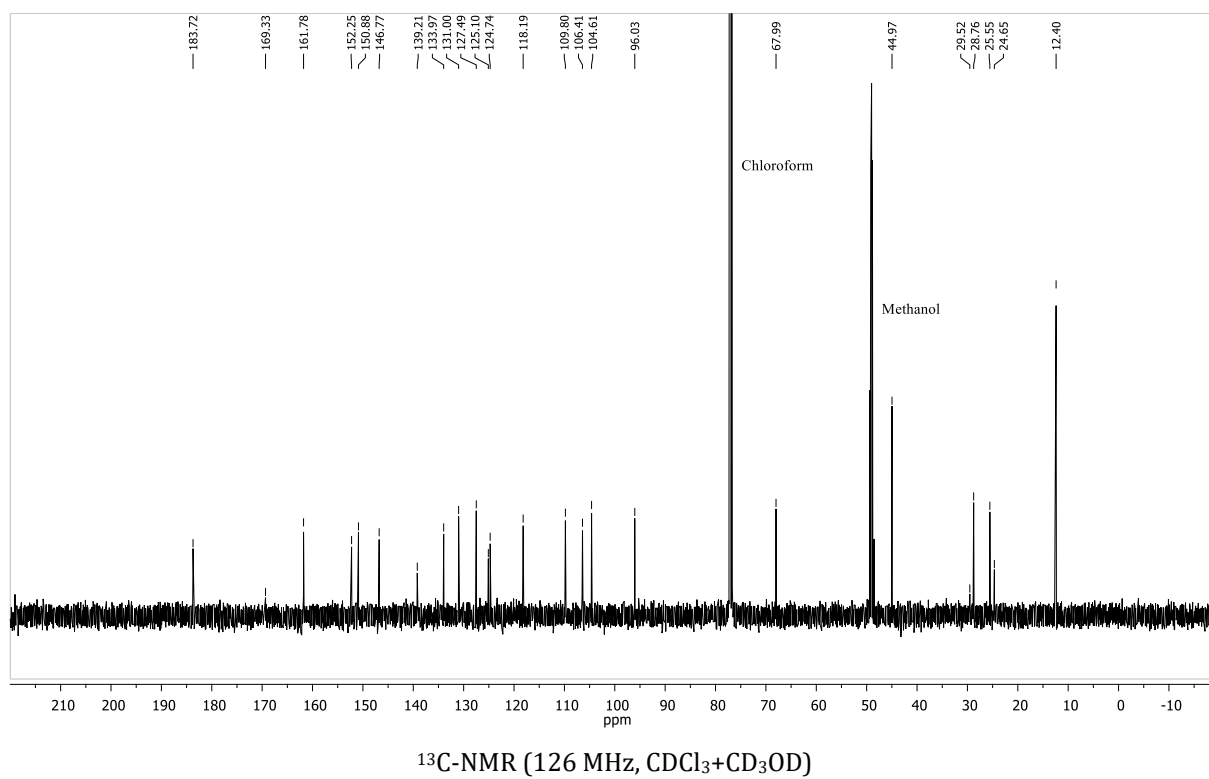
***O*-2-Phthalimidoethylphosphorodichloridat 18**



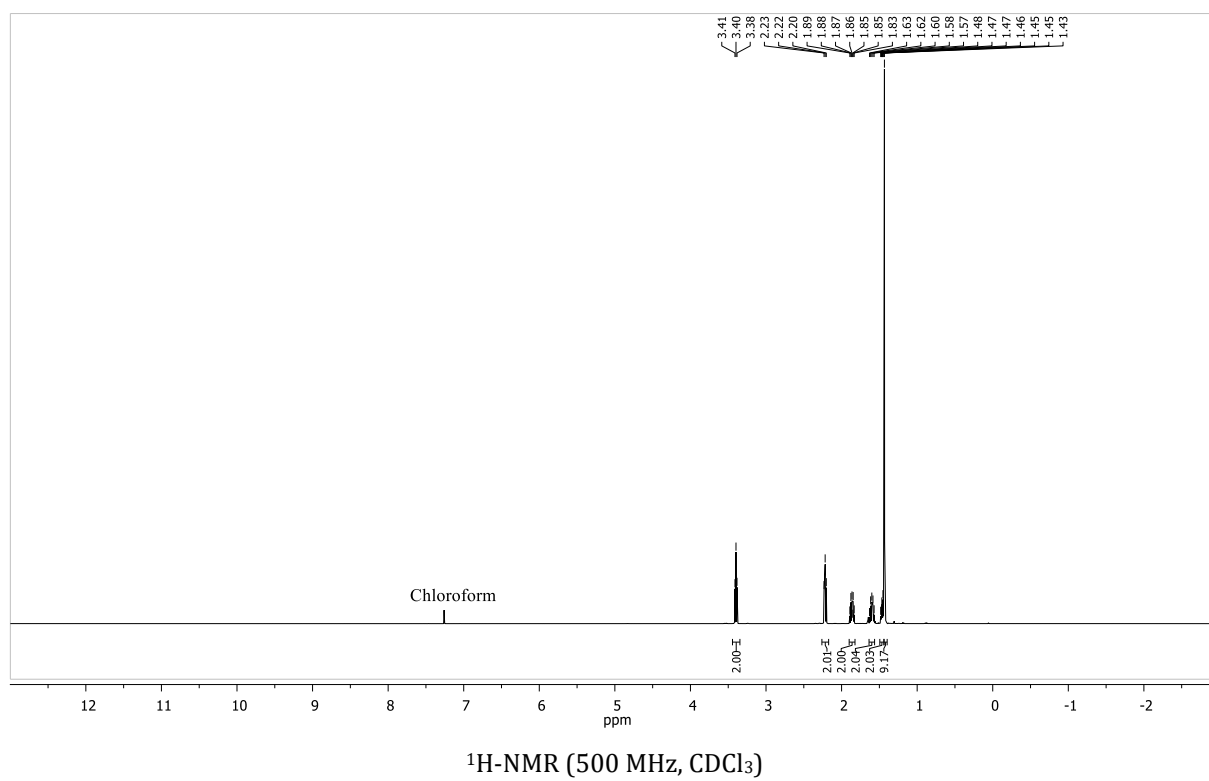
### 6-(9-Diethylamino-5-oxo-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-2-yloxy)hexansäure 22

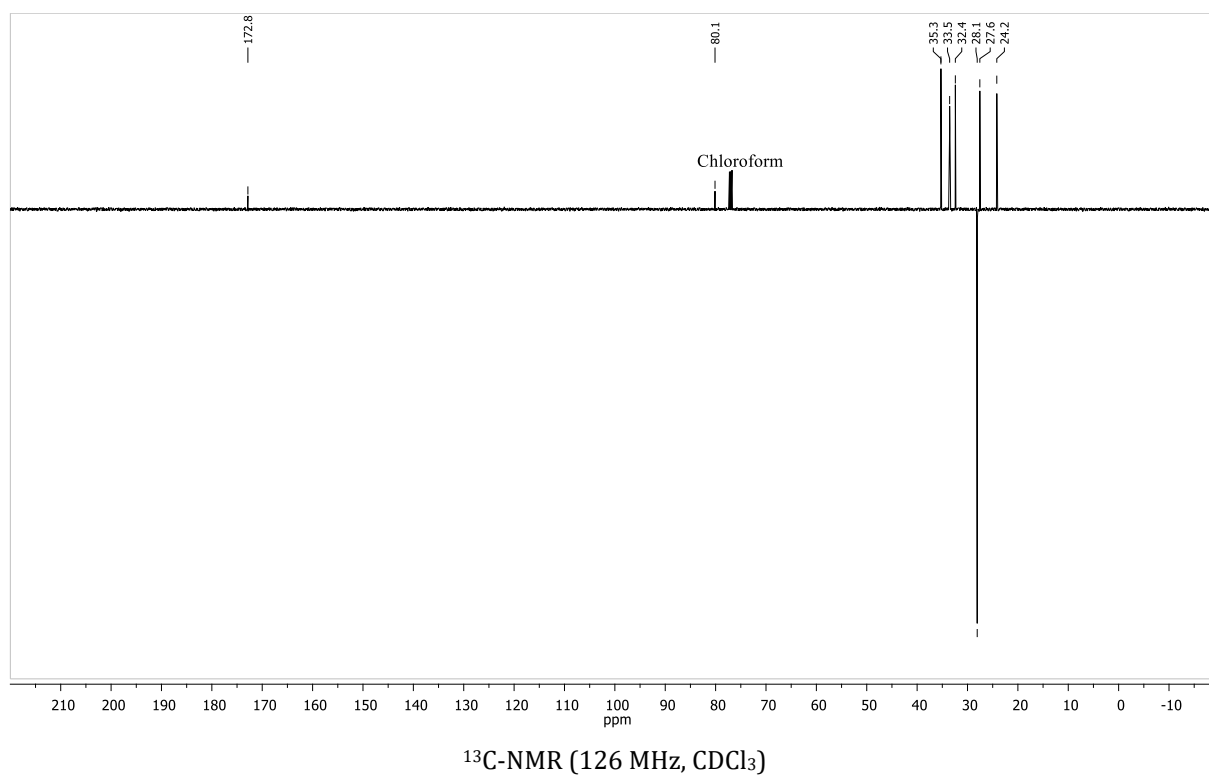




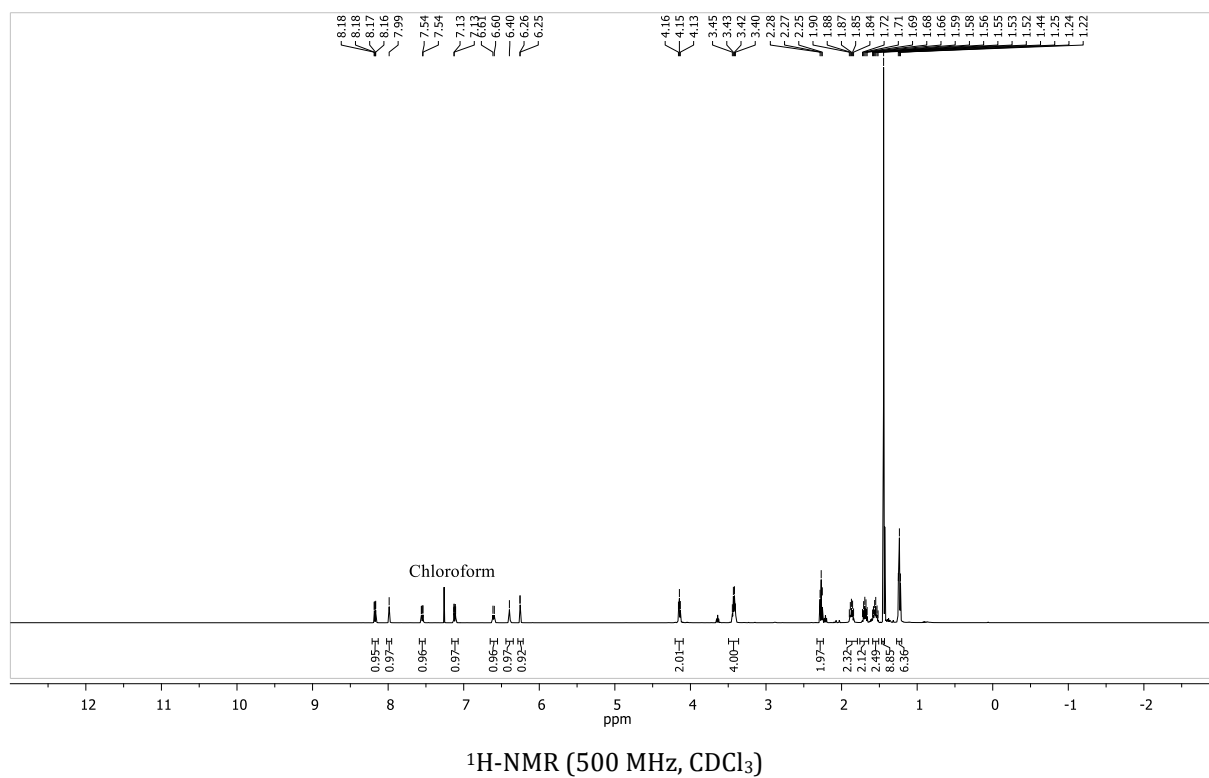


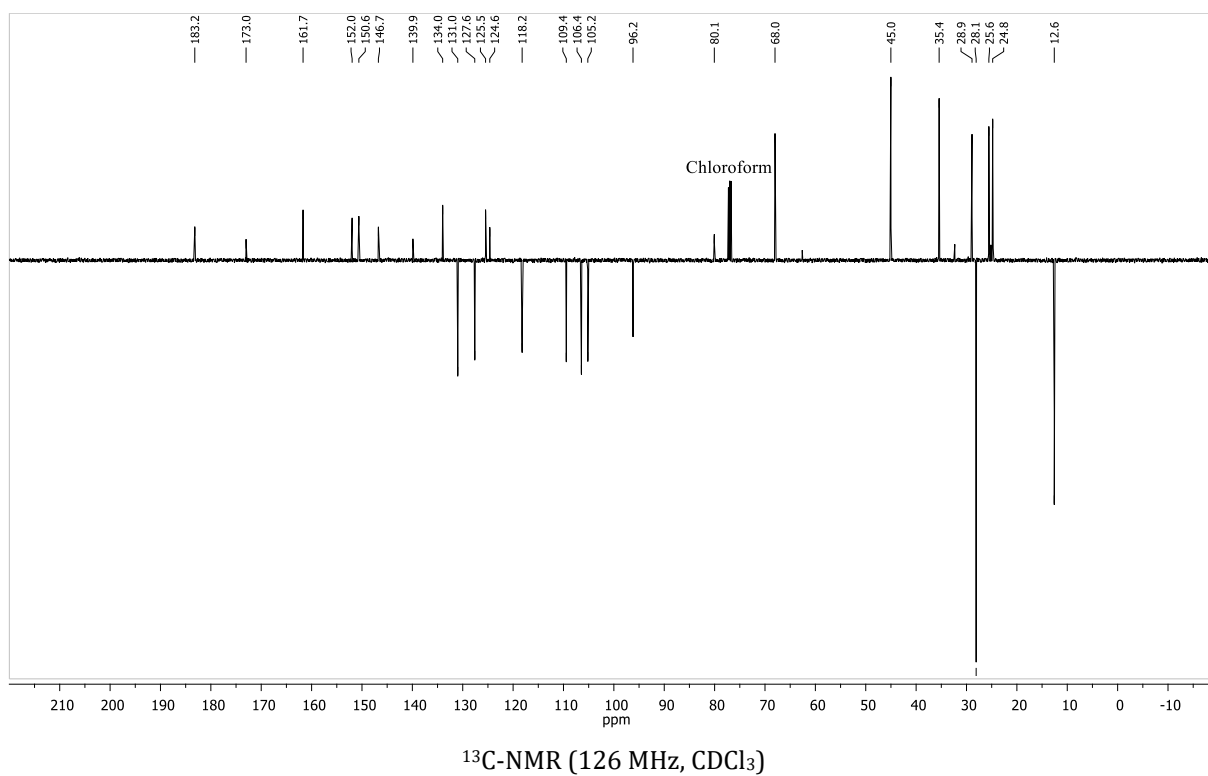
### 6-Bromohexansäure-*tert*-butylester 23



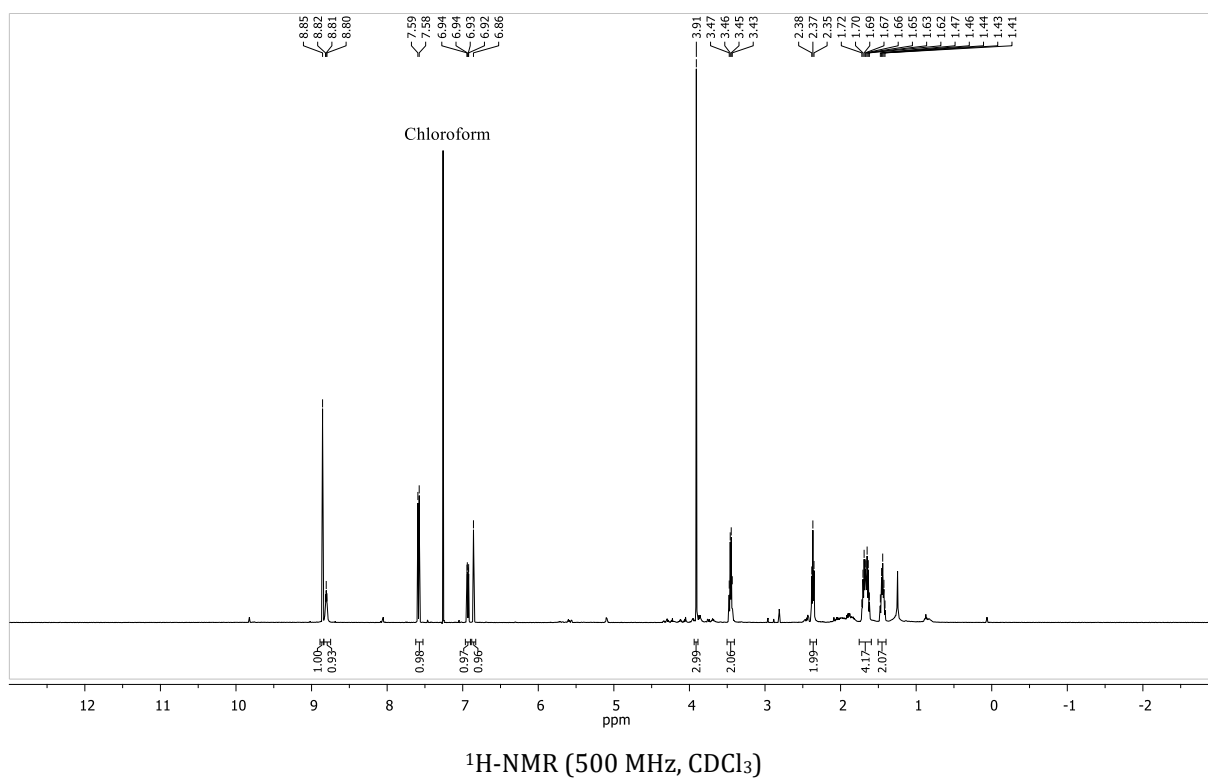


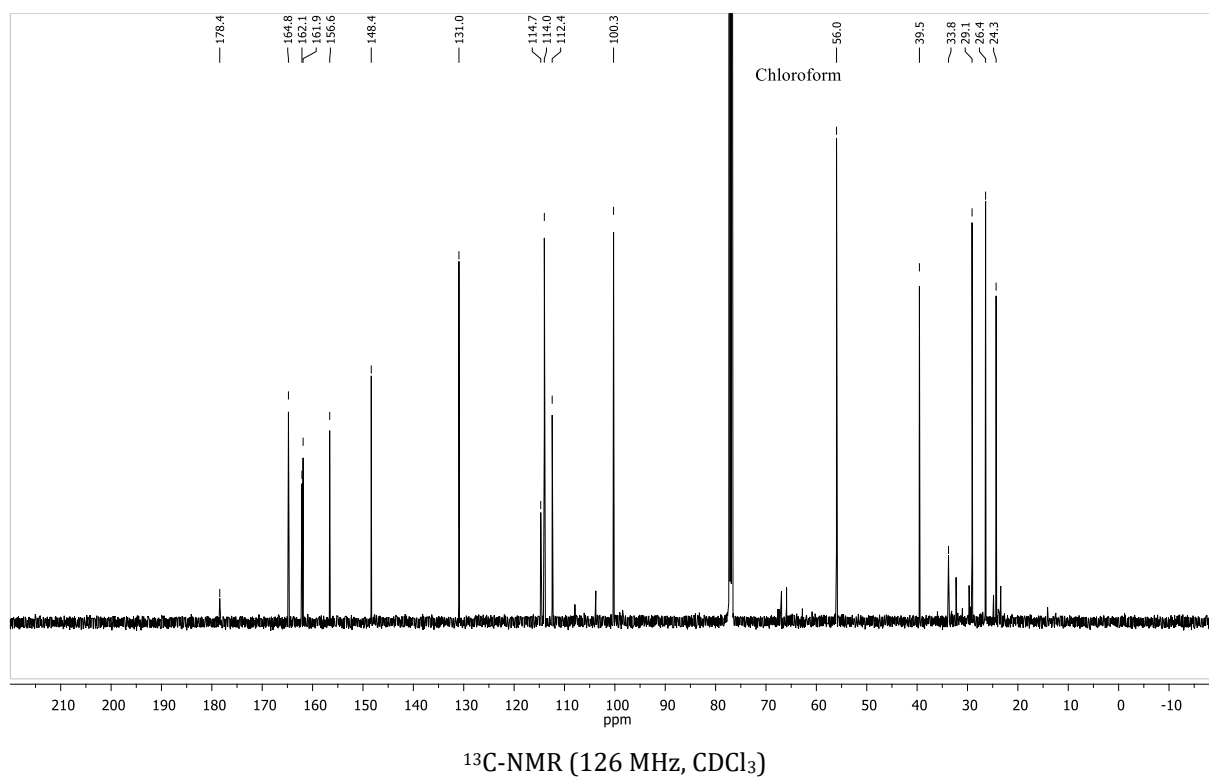
**6-(9-Diethylamino-5-oxo-5*H*-benzo[*a*]phenoxazin-2-yloxy)hexansäure-*tert*-butyl-ester 24**



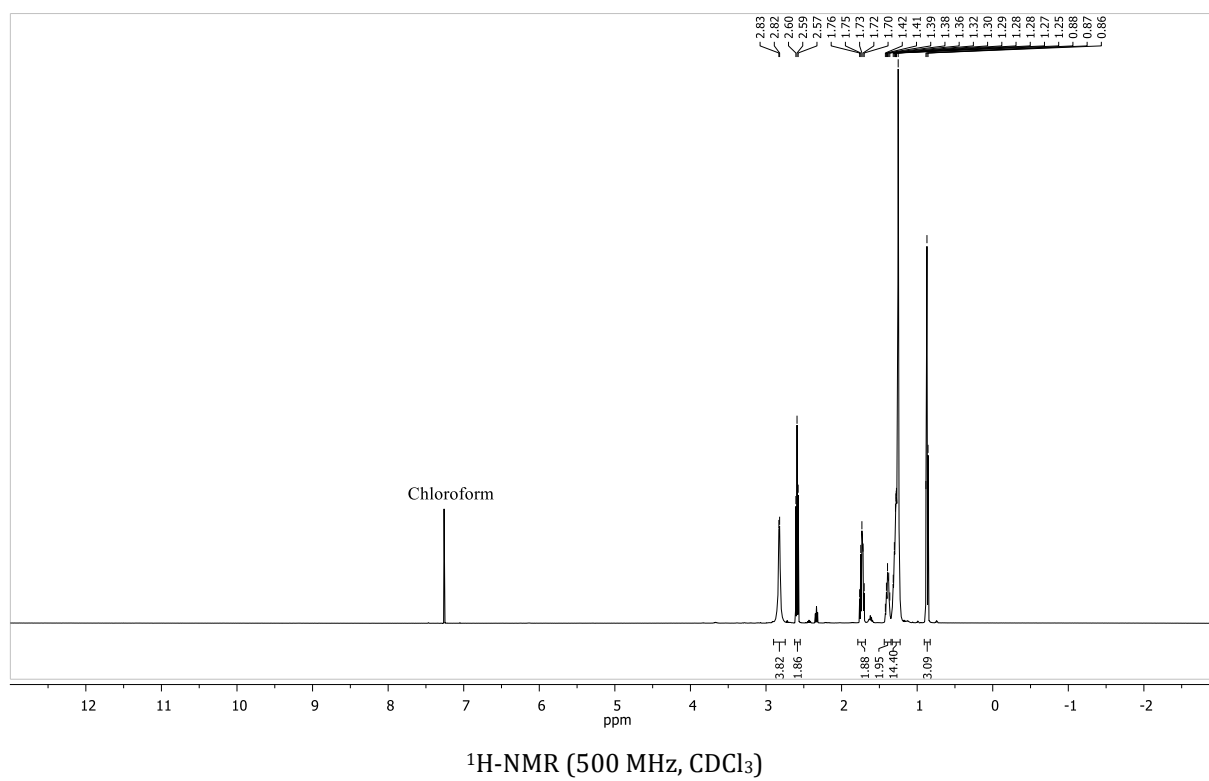


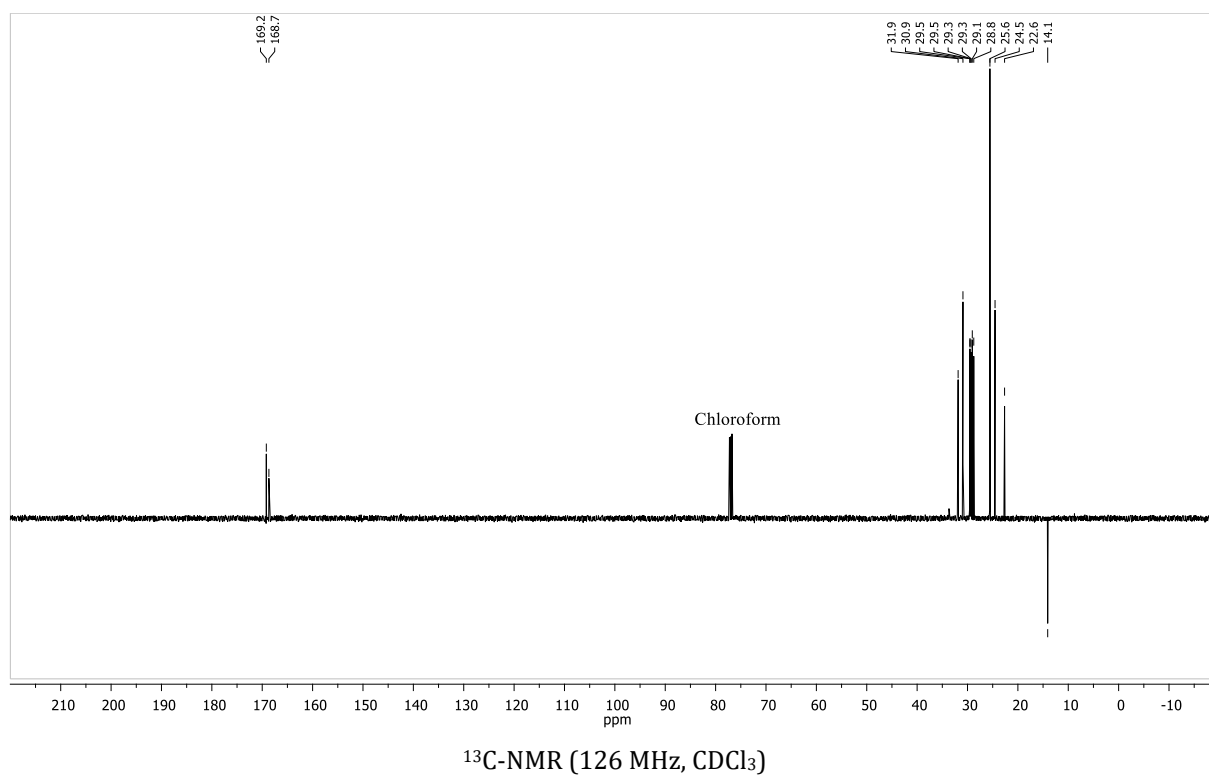
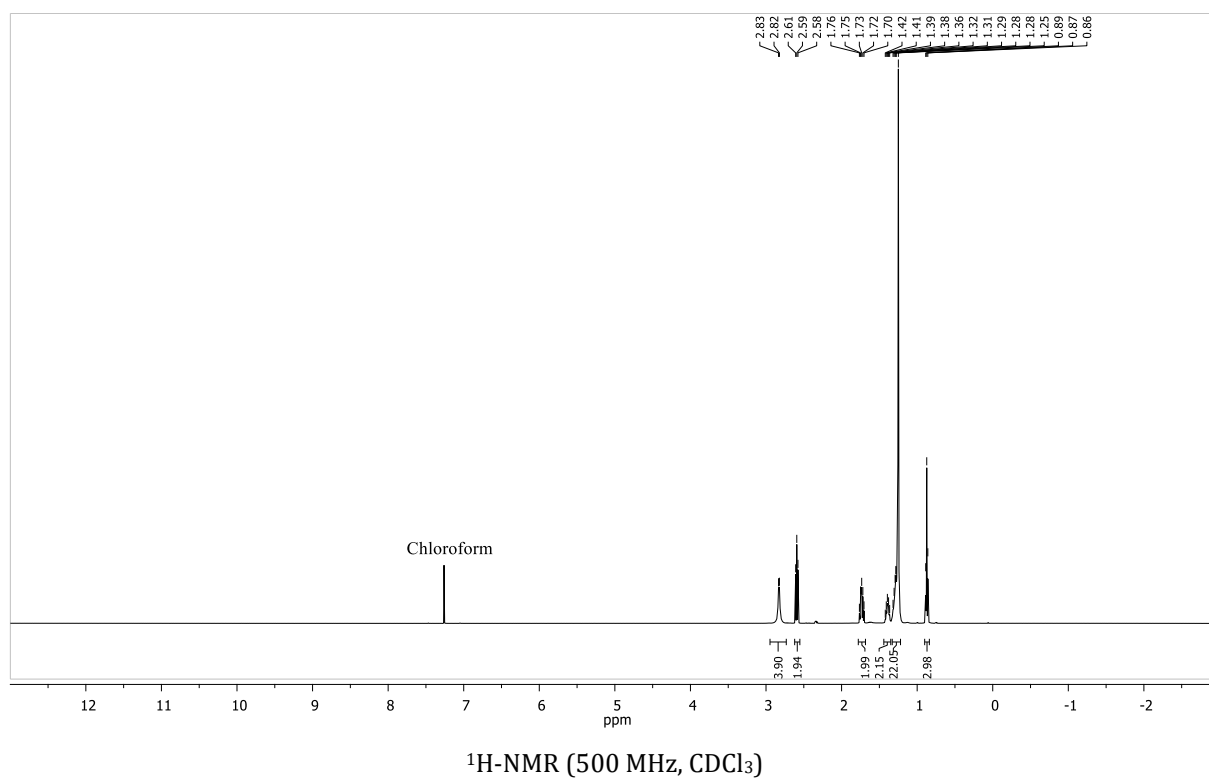
### 6-(7-Methoxy-2-oxo-2H-chromen-3-carboxamido)hexansäure 25

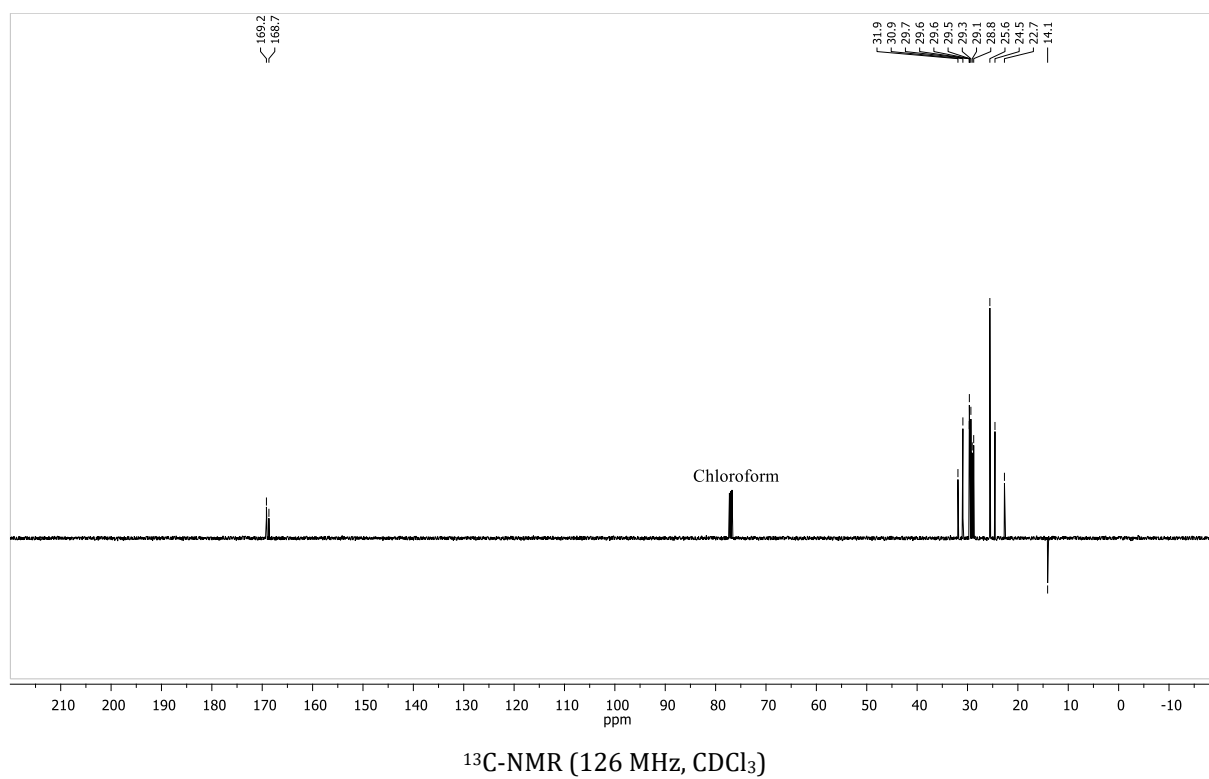




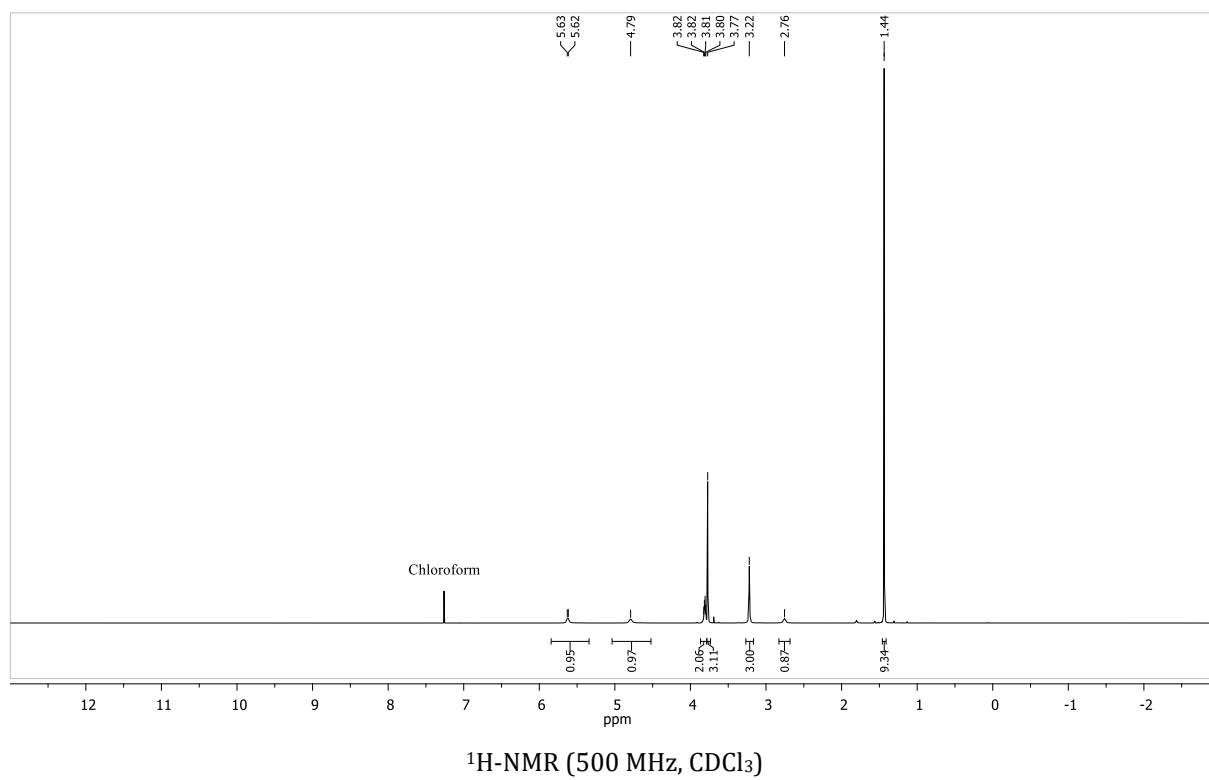
### Laurinsäure-*N*-succinimidylester 28

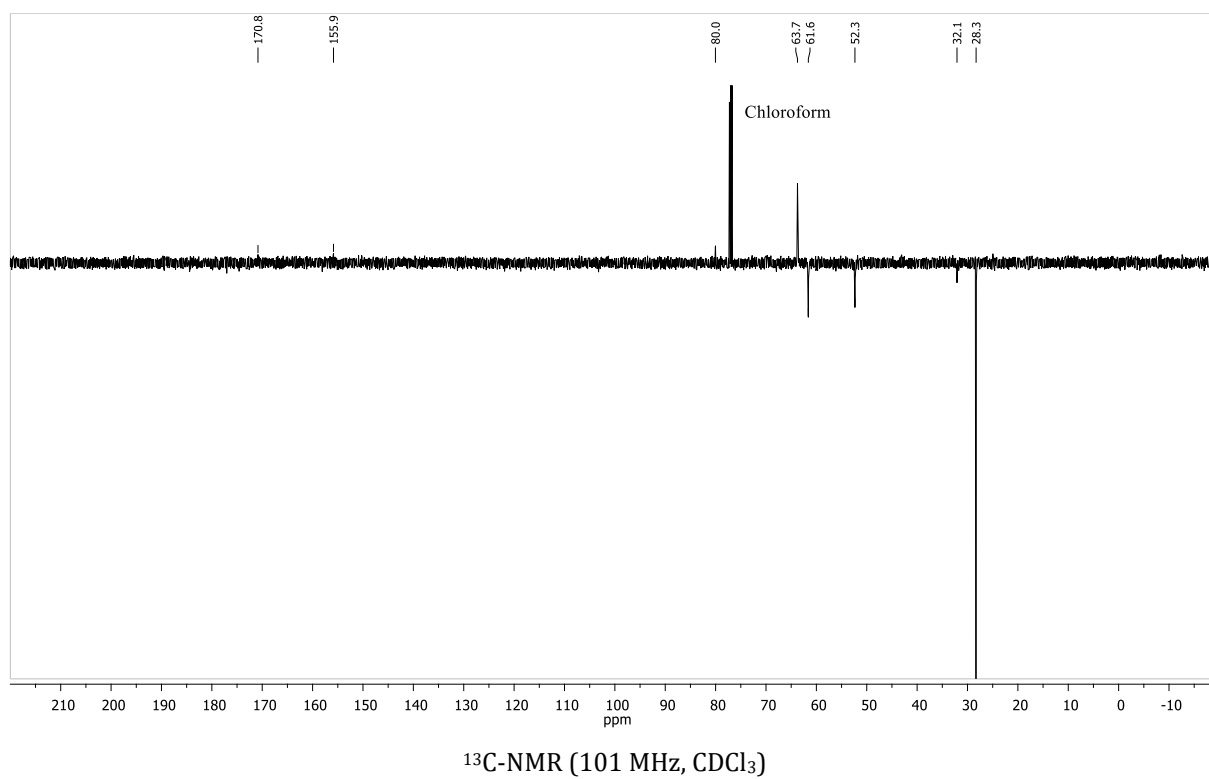


**Palmitinsäure-*N*-succinimidylester 29**

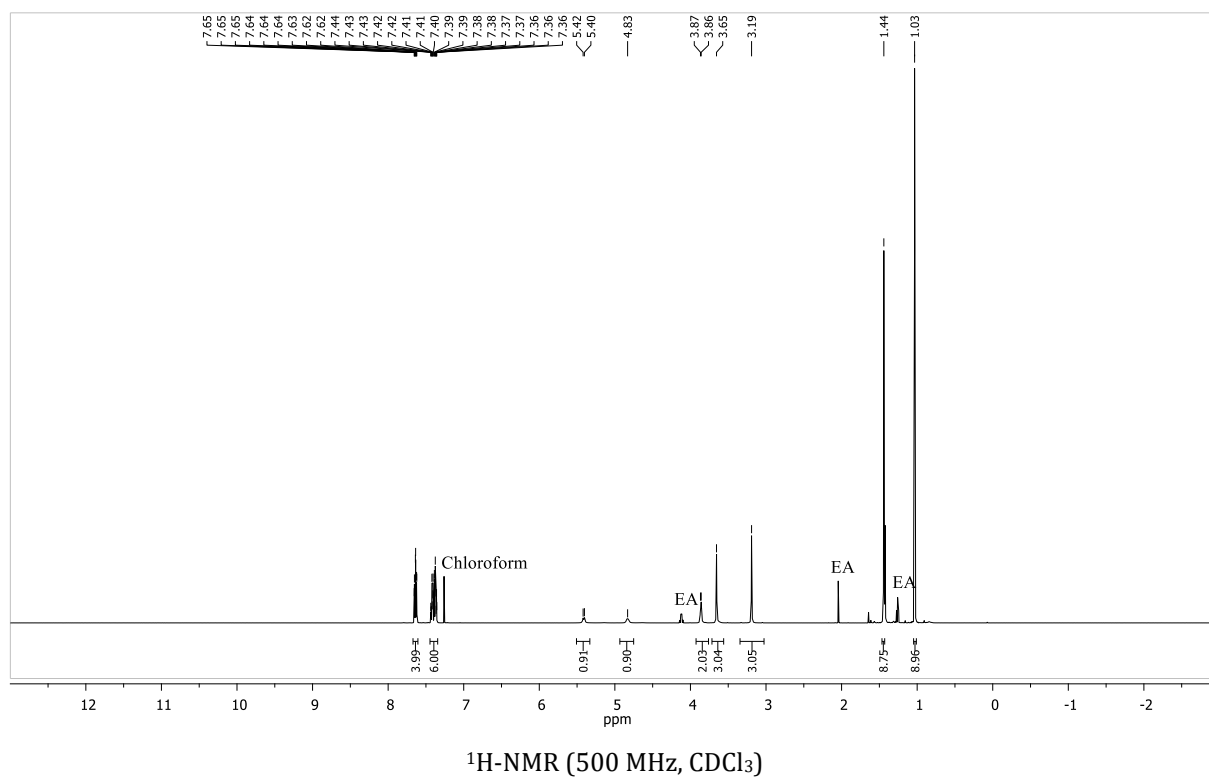


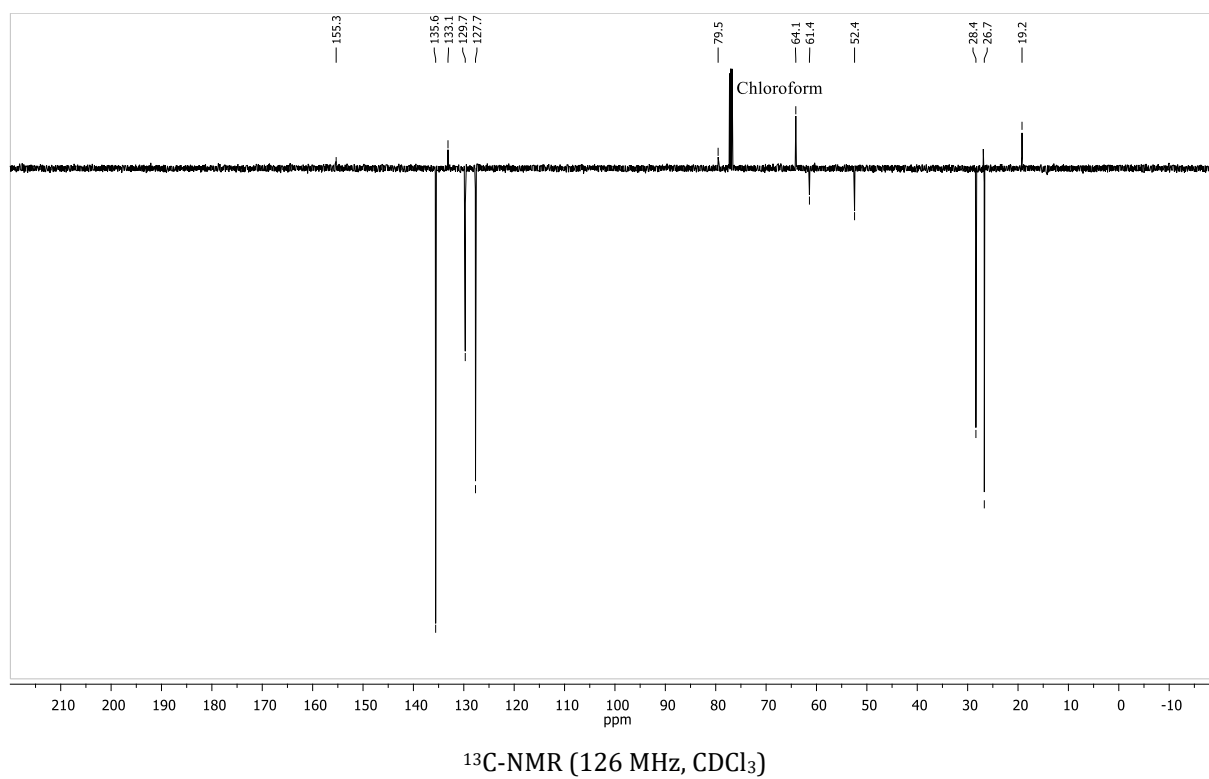
**(S)-3-Hydroxy-1-(methoxy(methyl)amino)-1-oxopropan-2-ylcarbaminsäure-*tert*-butylester 36**



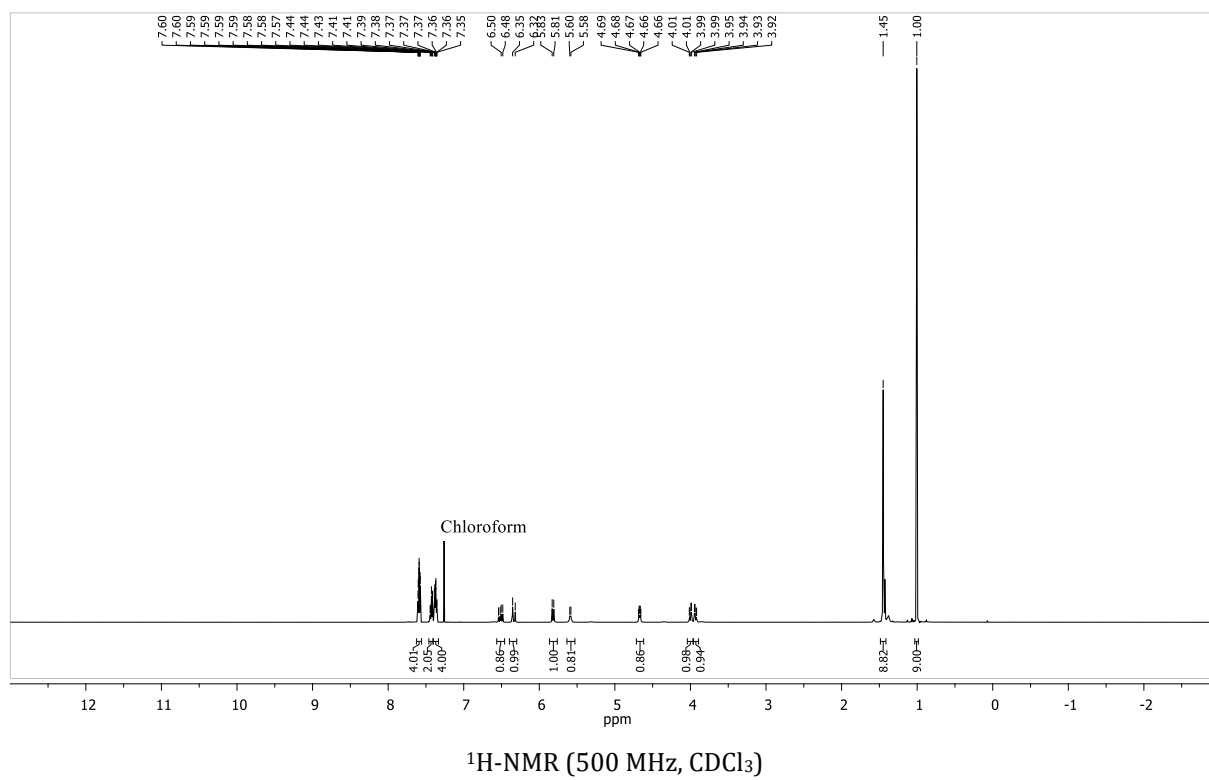


**(*S*)-*N*-Methoxy-*N*-methyl-3-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-(*N*-*tert*-butyloxycarbonyl)aminopropanamid 37**

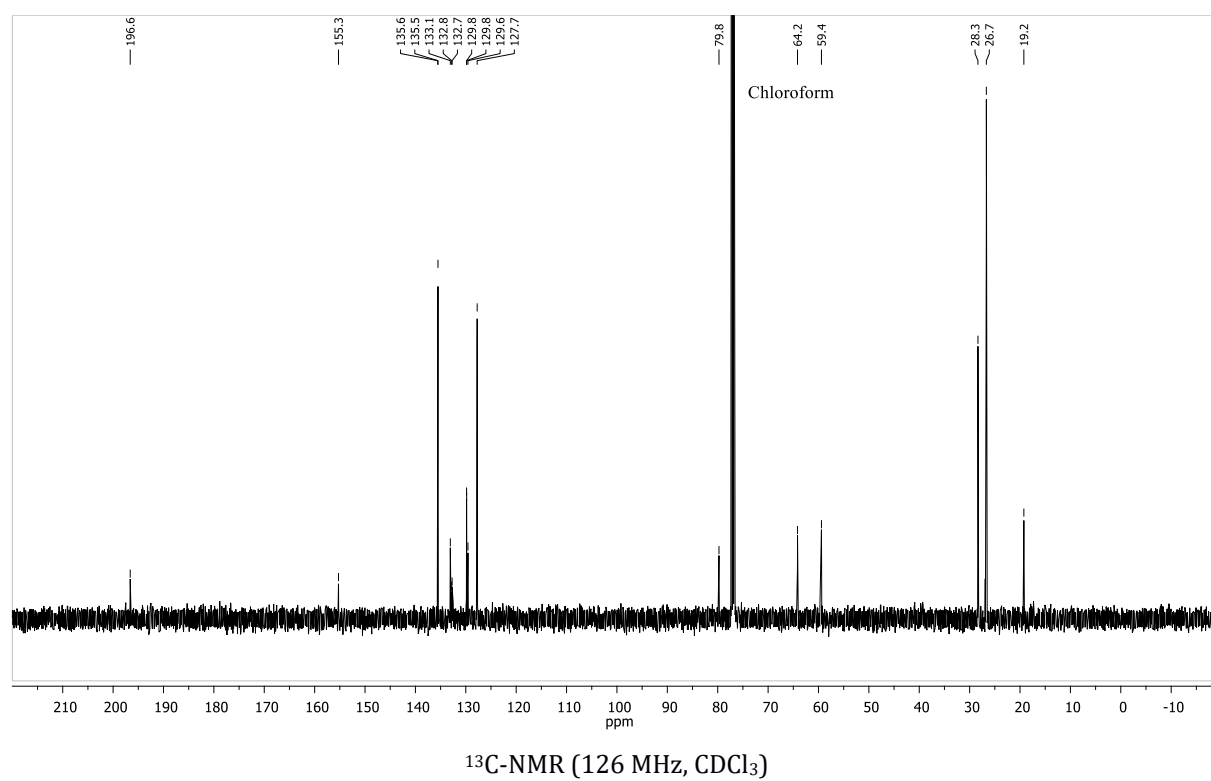




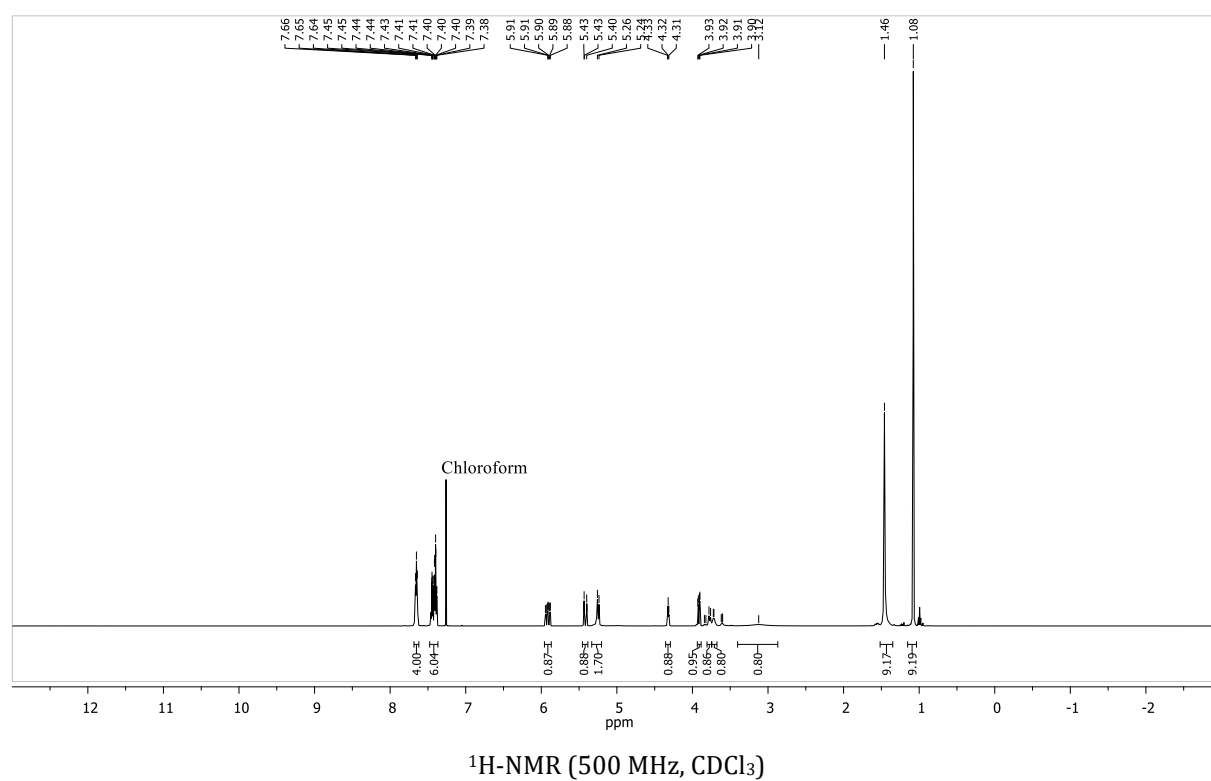
**(S)-1-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-(*N*-*tert*-butyloxycarbonyl)aminopent-4-en-3-on 38**

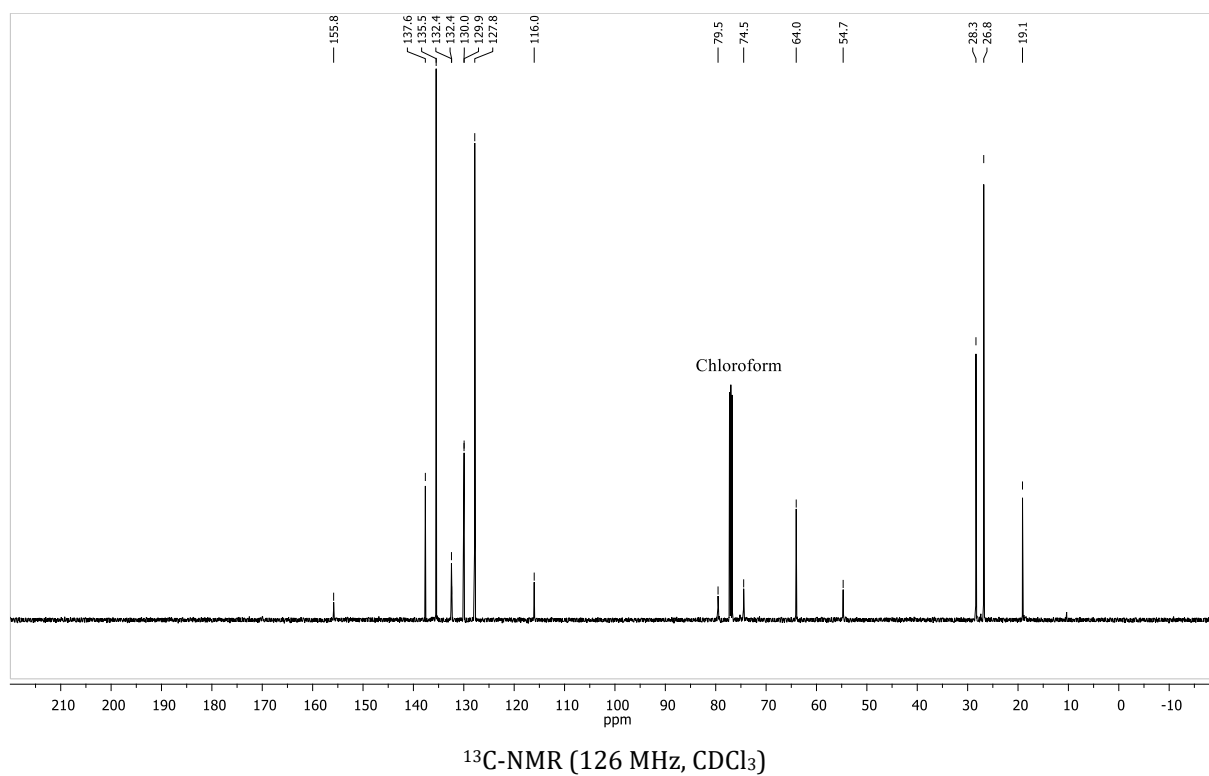




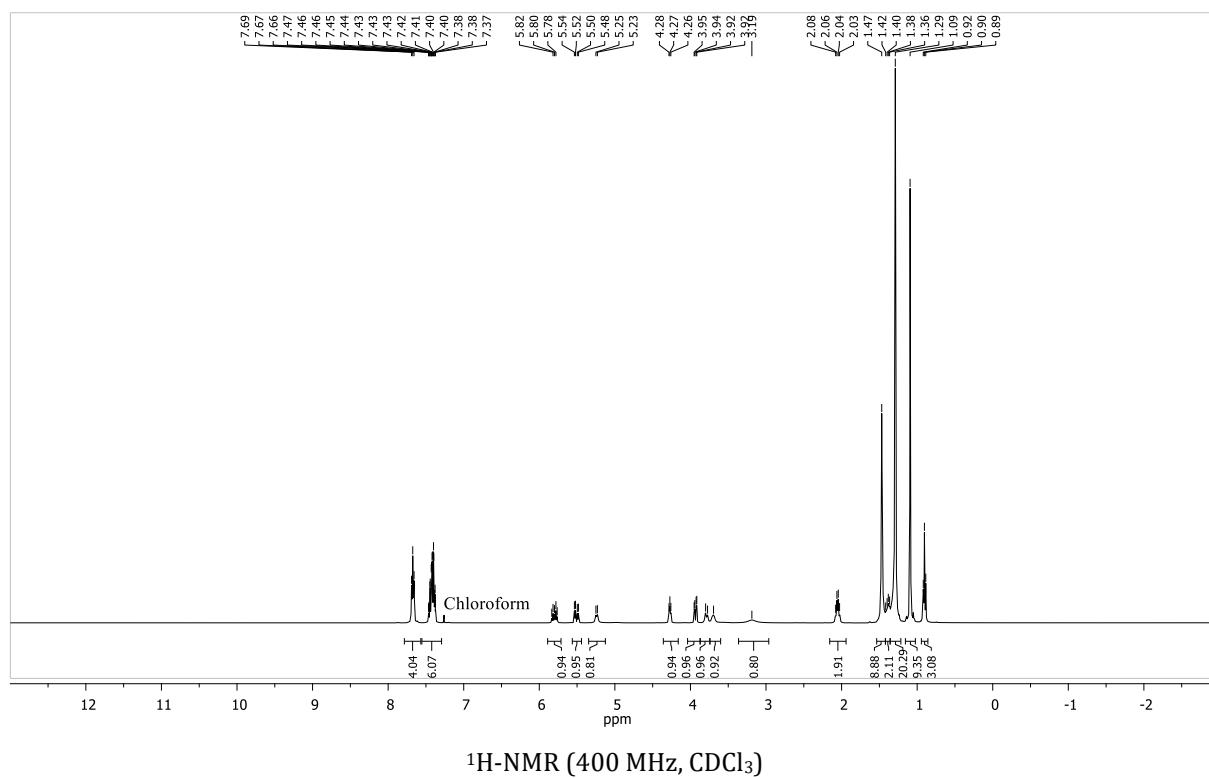


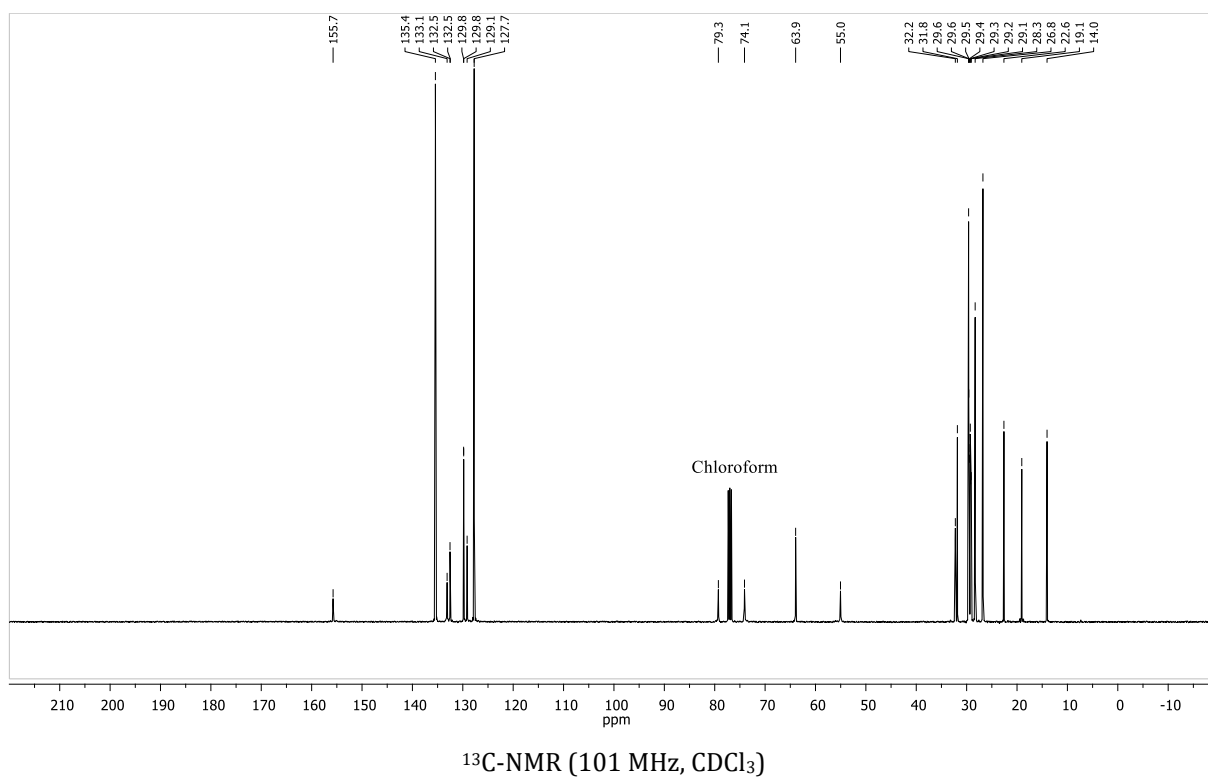
**(2*S*,3*R*)-1-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-(*N*-*tert*-butyloxycarbonyl)aminopent-4-en-3-ol 39**



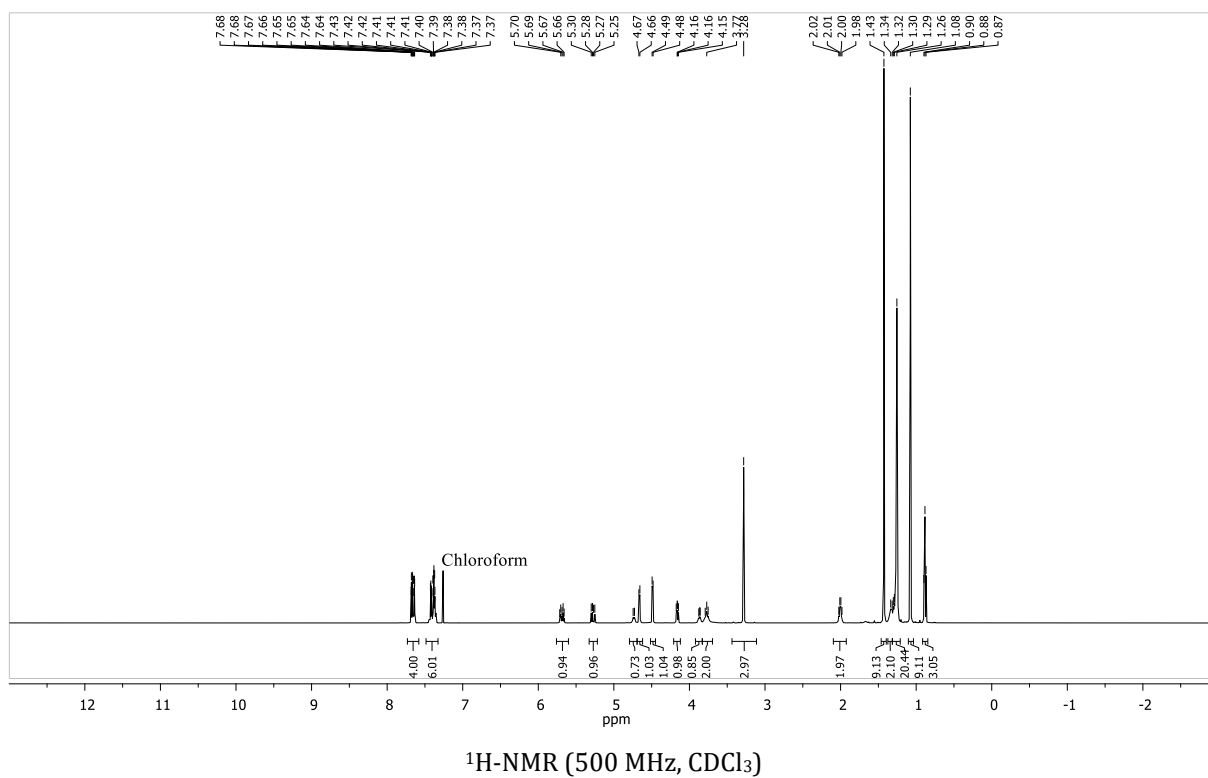


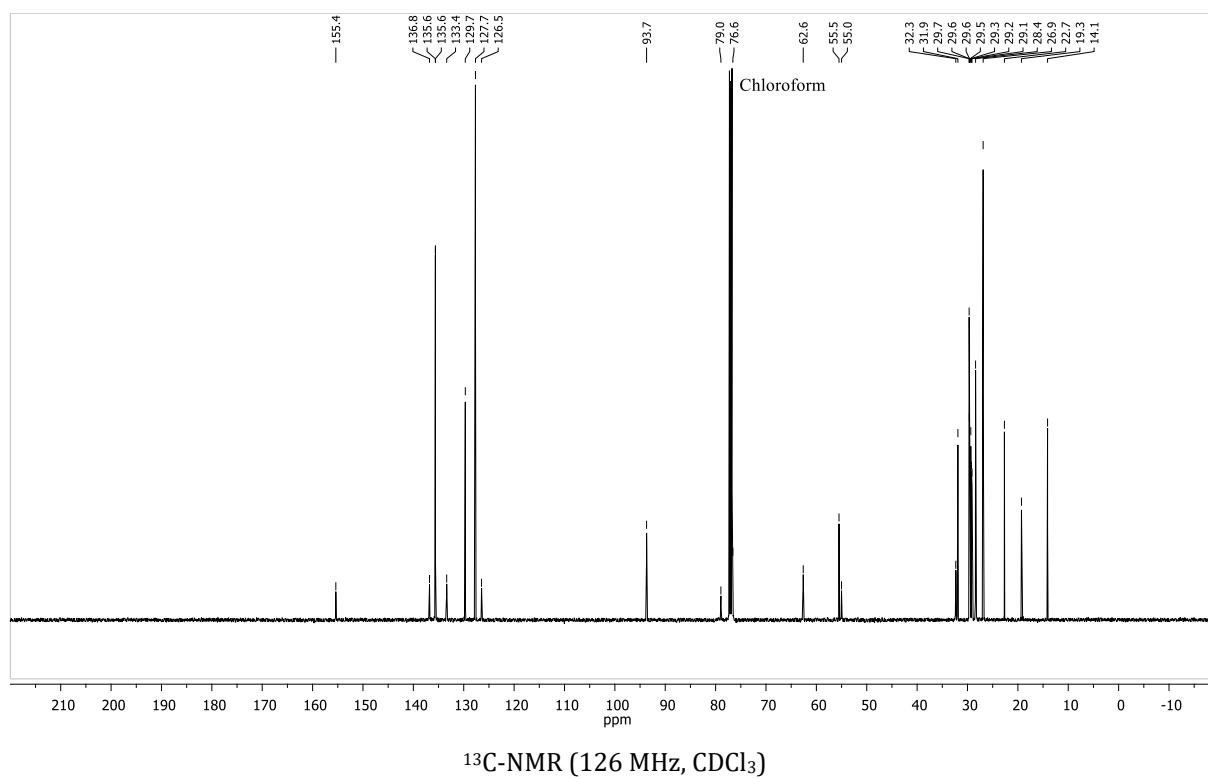
**(2*S*,3*R*,*E*)-1-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-(*N*-*tert*-butyloxycarbonyl)amino-octadec-4-en-3-ol 40**



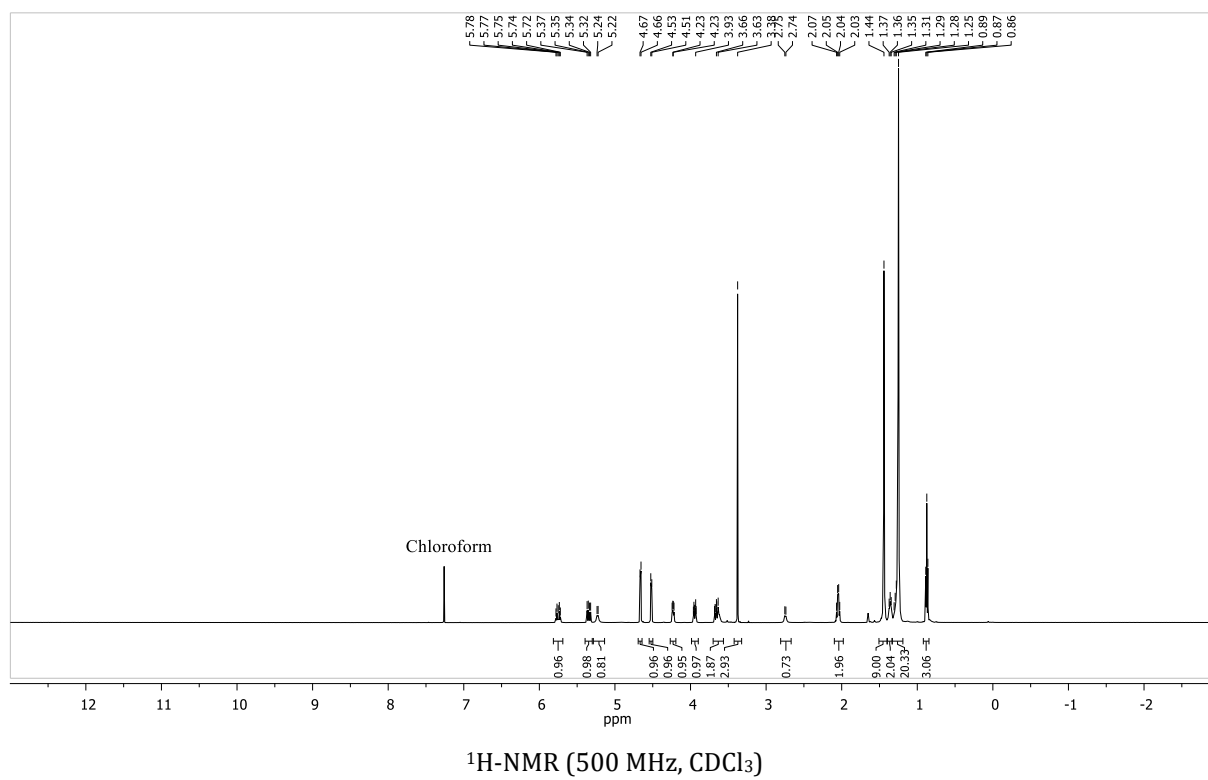


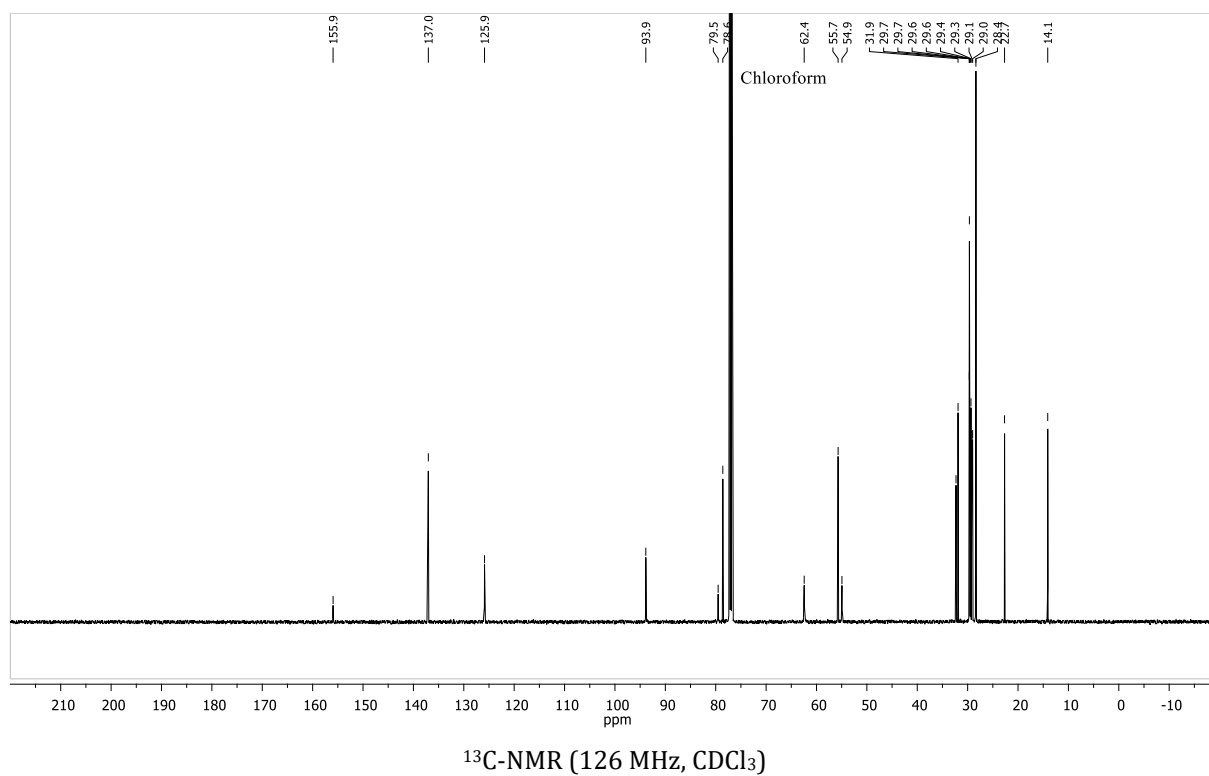
**(2*S*,3*R*,*E*)-1-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-3-(methoxymethoxy)octadec-4-en-2-yl-carbaminsäure-*tert*-butylester 41**



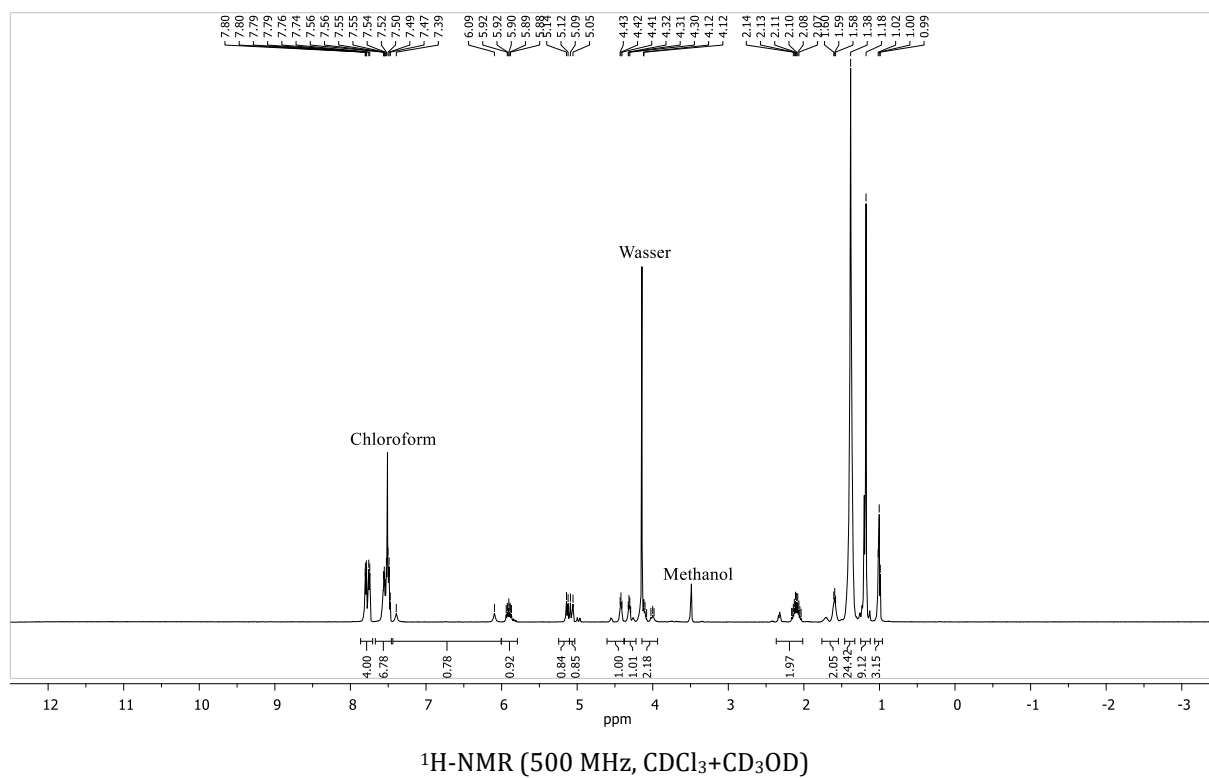


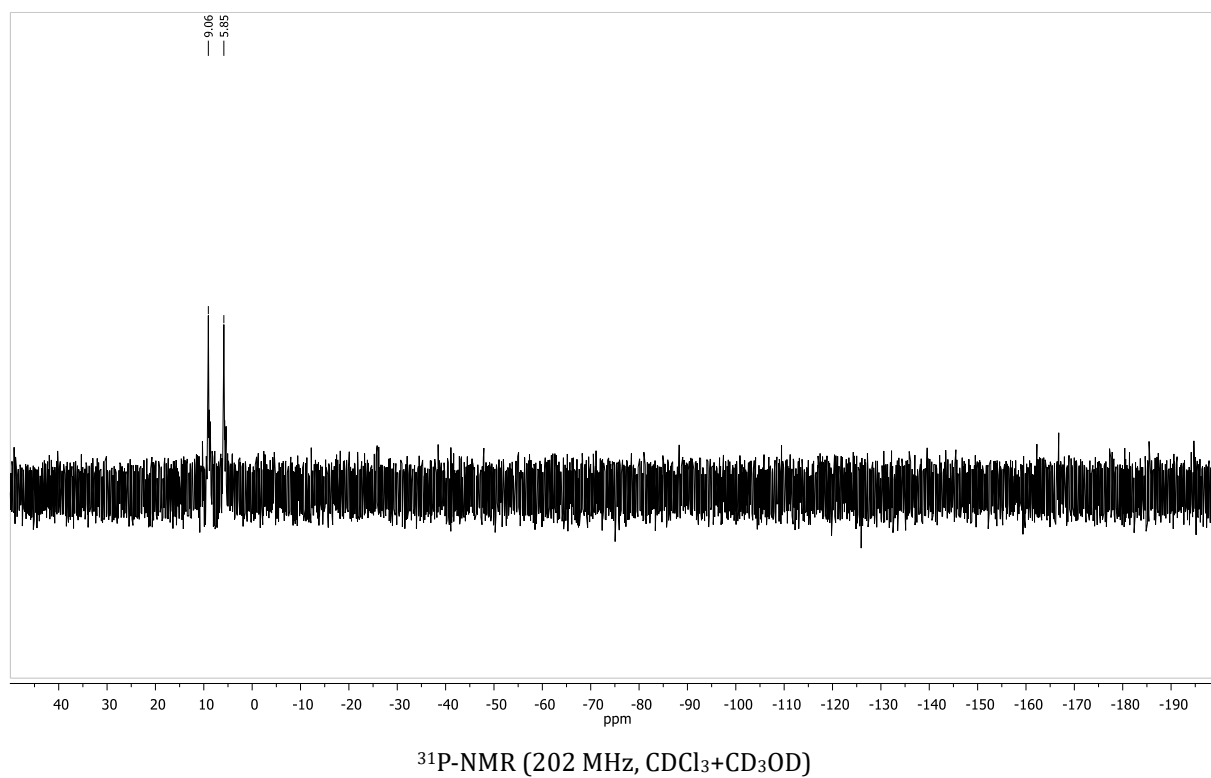
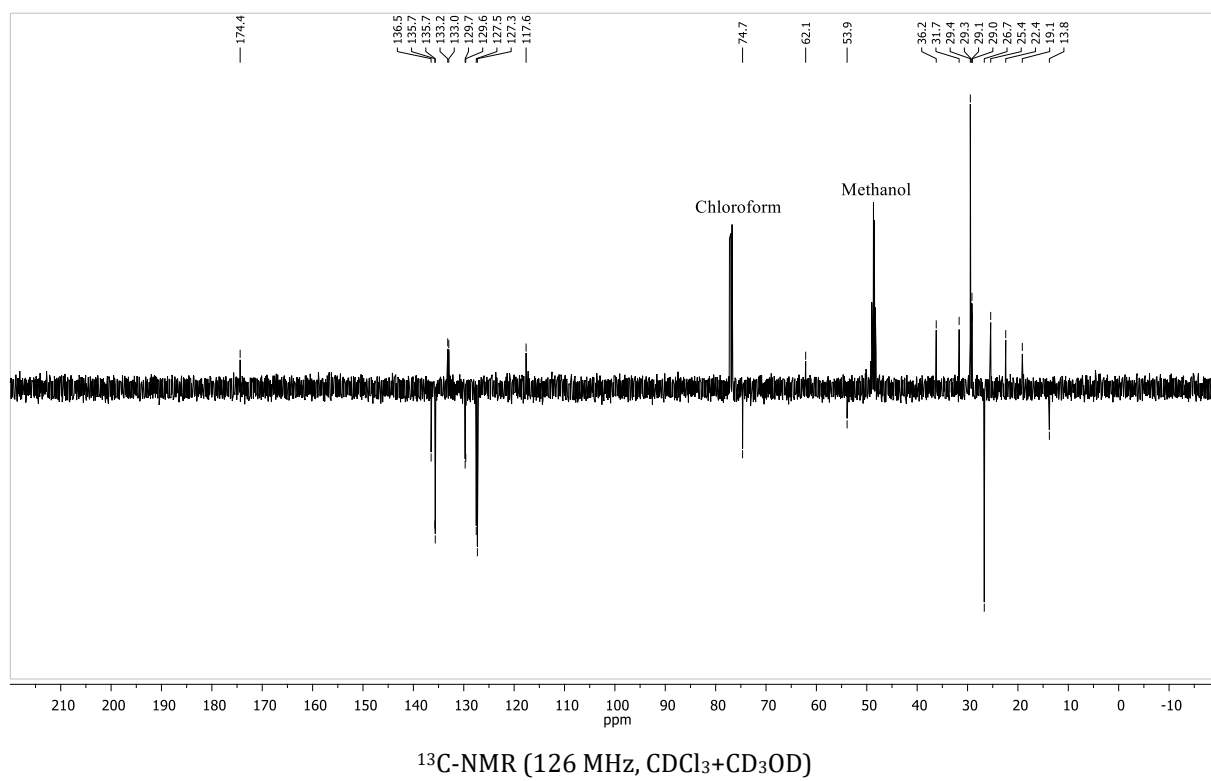
**(2*S*,3*R*,*E*)-1-hydroxy-3-(methoxymethoxy)octadec-4-en-2-ylcarbaminsäure-*tert*-butylester 42**



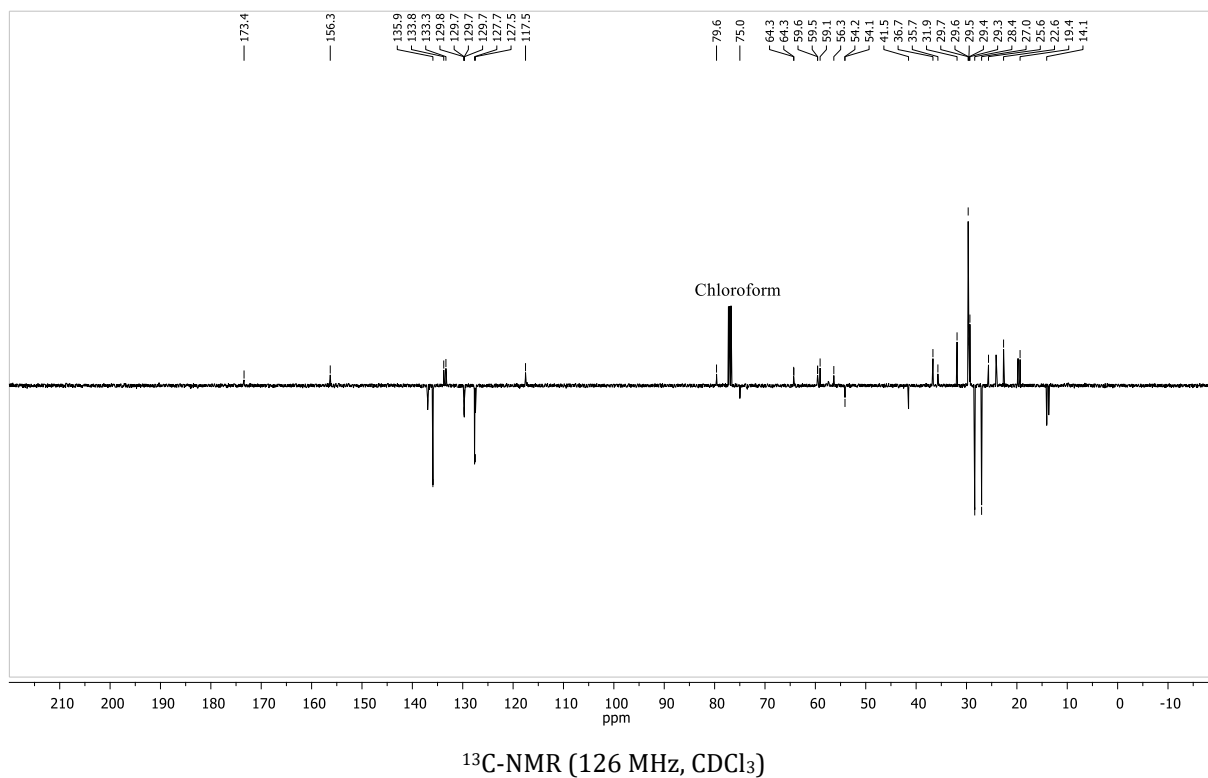
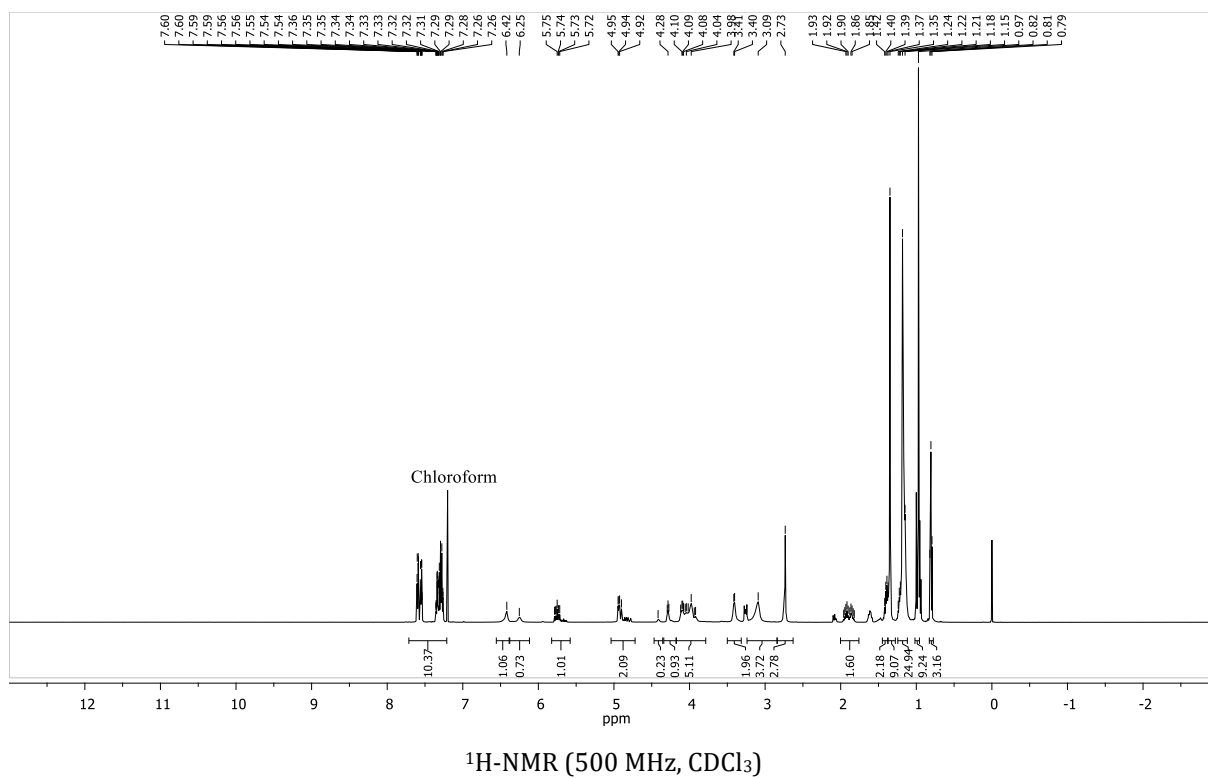


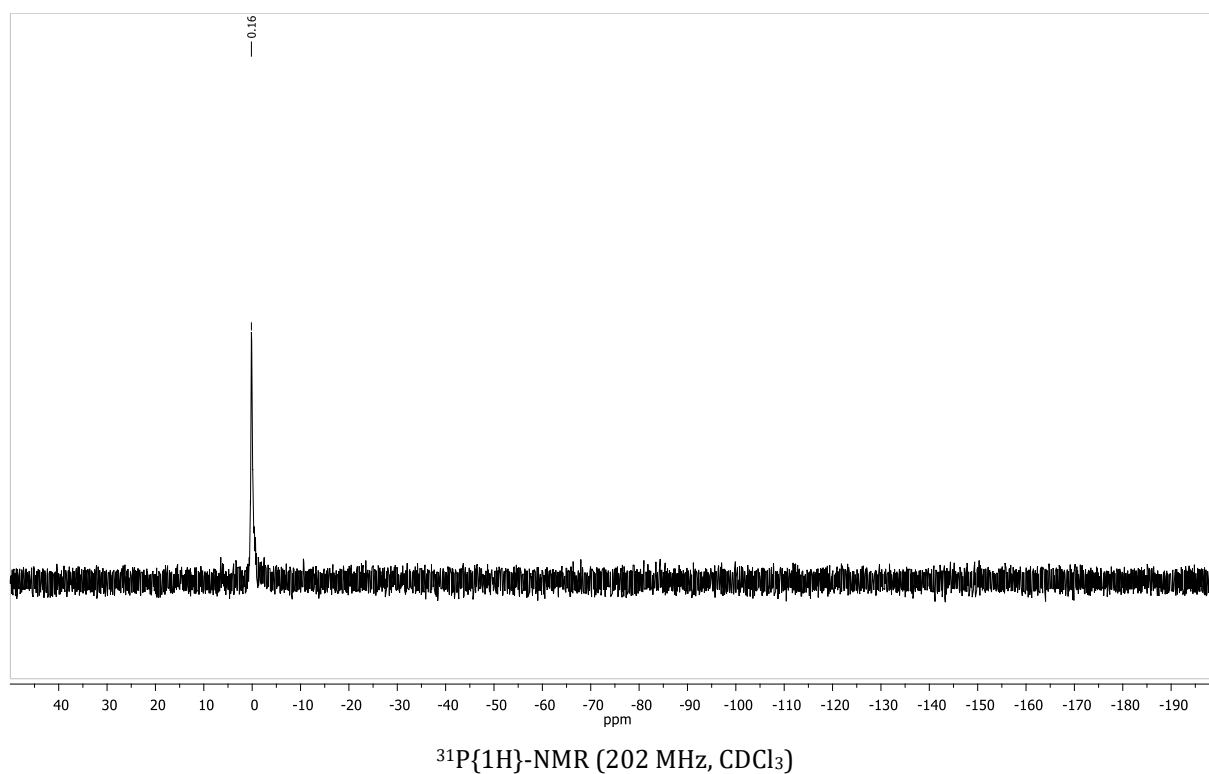
**(2*S*,3*R*)-3-(*tert*-Butyldiphenylsilyloxy)-2-hexadecanoylamino-pent-4-enyl-1-*H*-phosphonsäure 45**



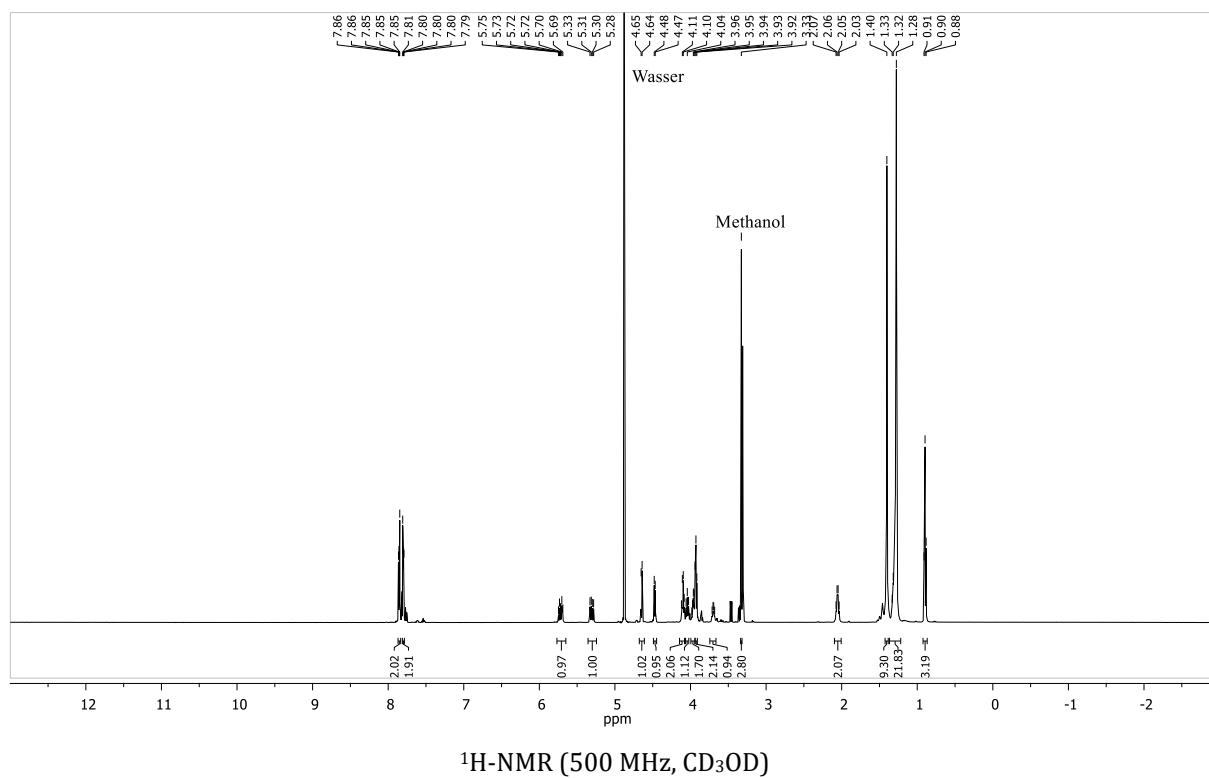


***N*-2-{2-[(2*S*,3*R*)-3-(*tert*-butyldiphenylsilyloxy)-2-hexadecanoylamino]pent-4-enyl-1-phospho}ethyl(methyl)amino}ethylcarbaminsäure-*tert*-butylester 46**

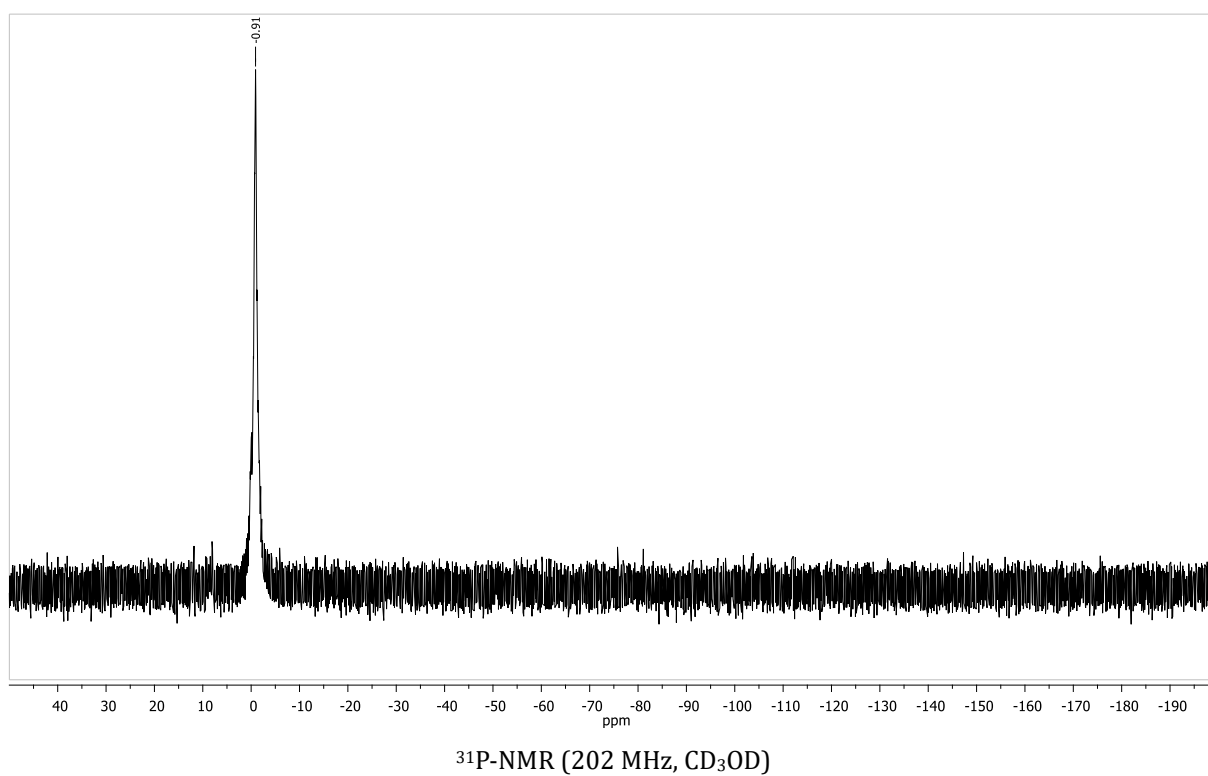
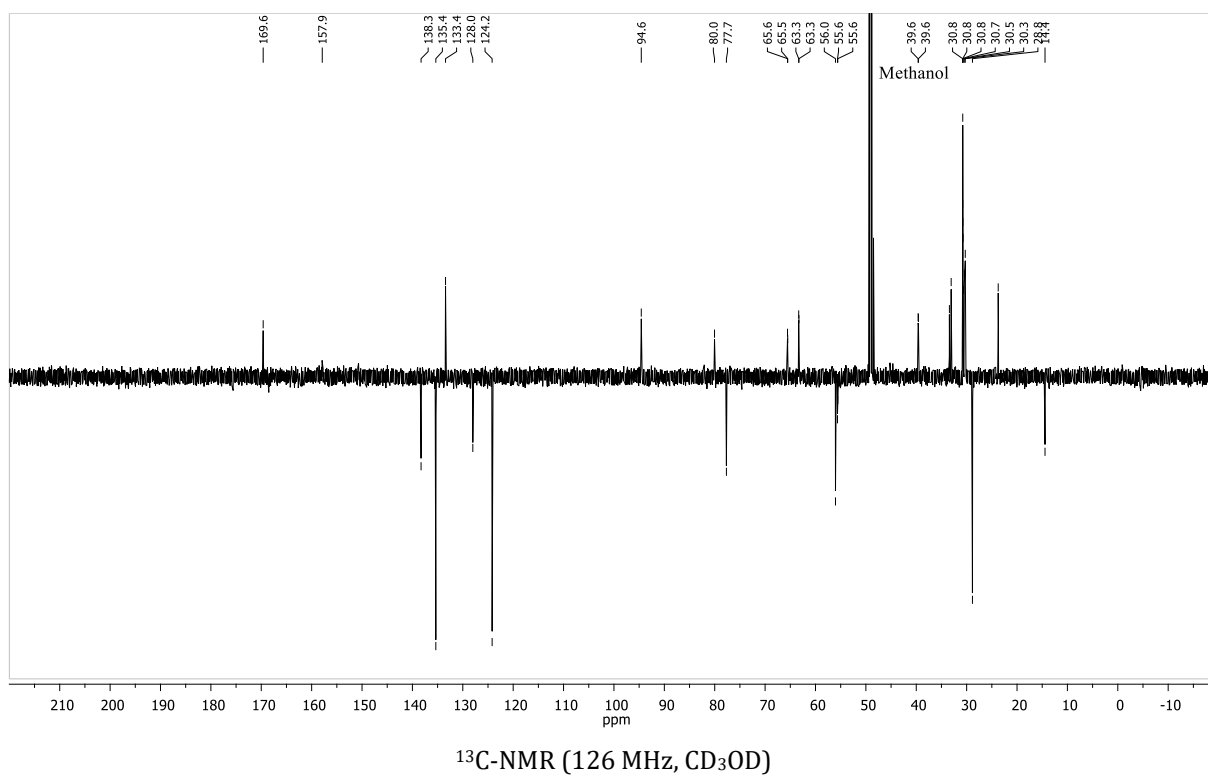




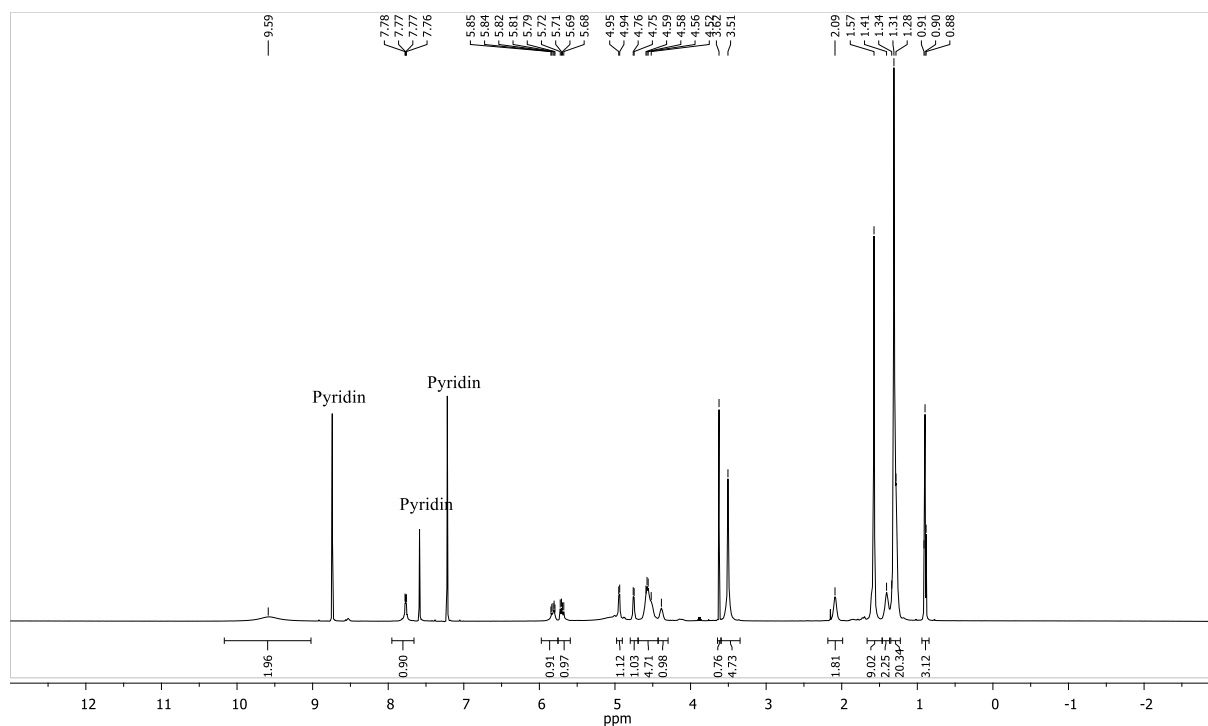
***N*-[*(2S,3R,E)*-2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-3-(methoxymethoxy)octadec-4-en-1-phosphoethyl]isoindolin-1,3-dion 49**



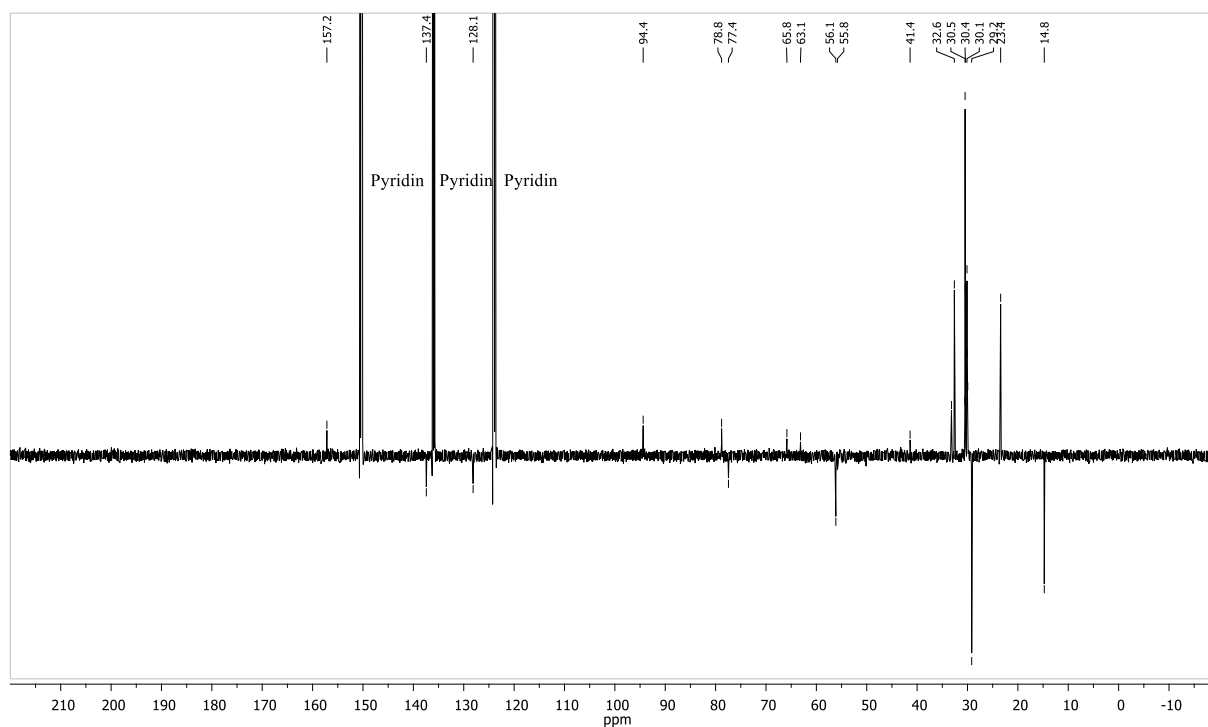




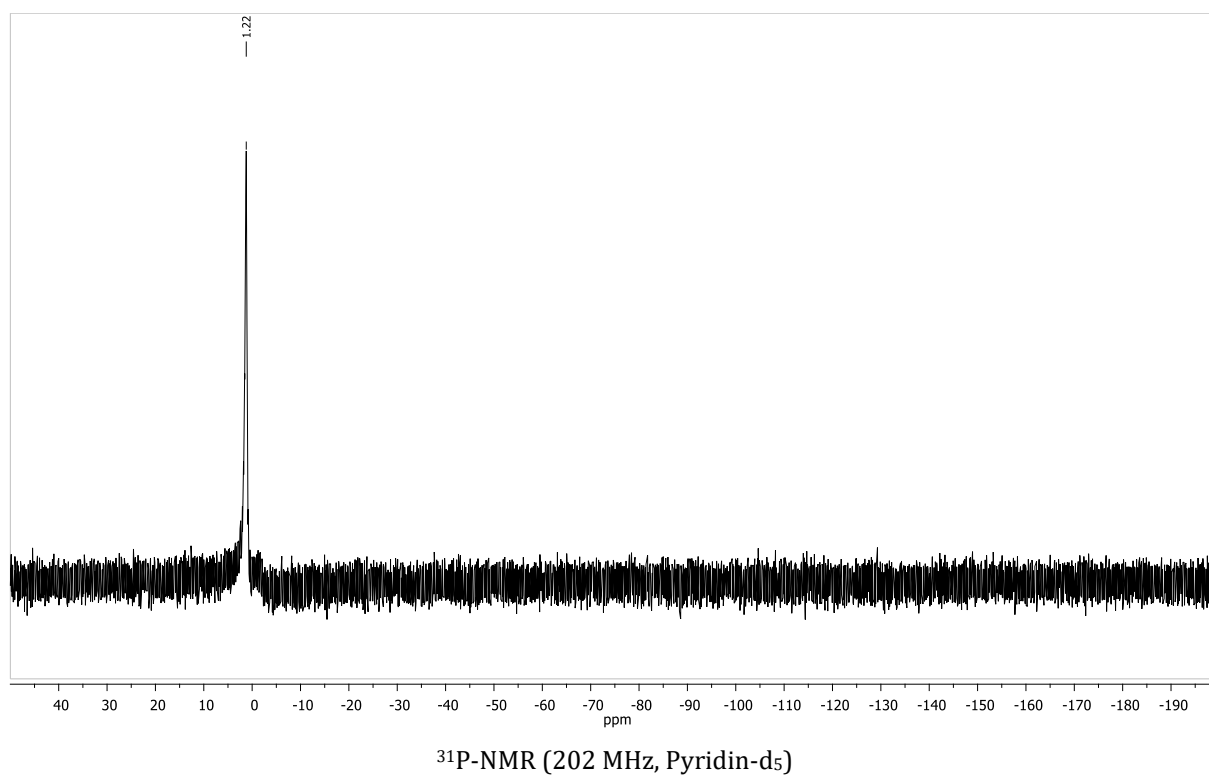
**(2*S*,3*R*,*E*)-2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-3-(methoxymethoxy)octadec-4-en-1-phosphoethylamin 50**



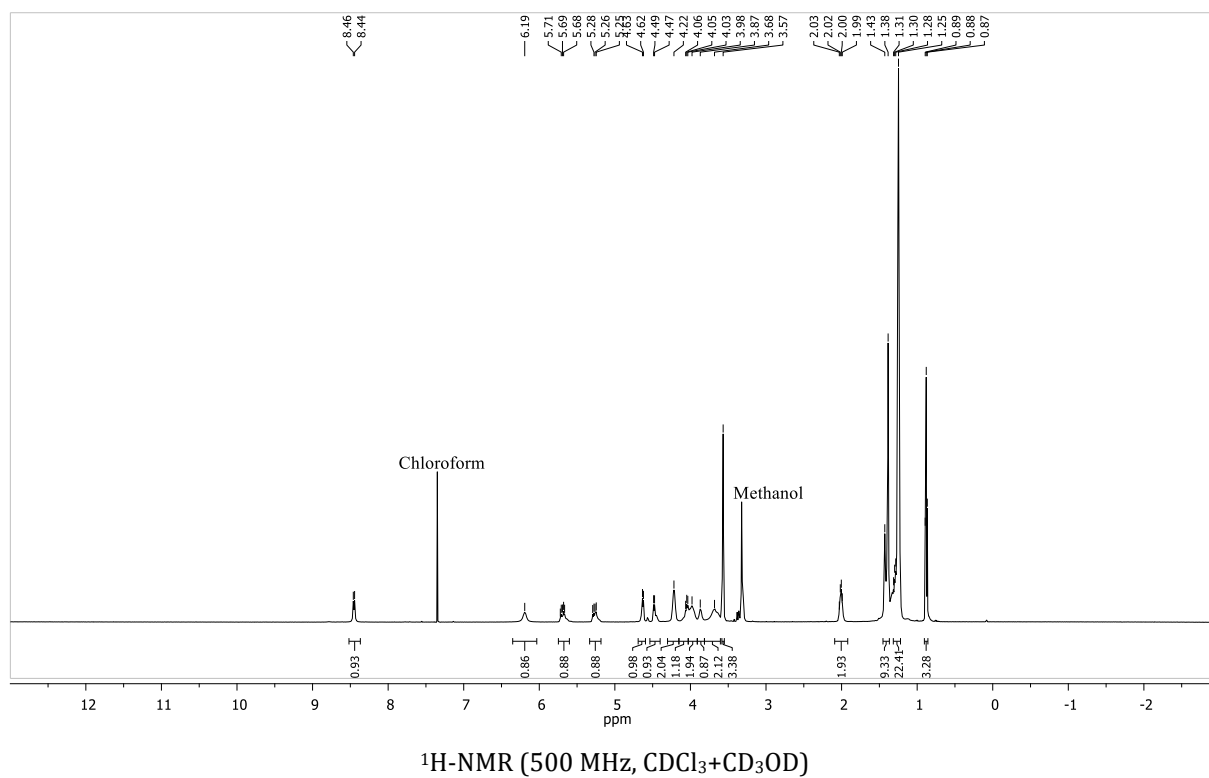
$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, Pyridin- $\text{d}_5$ )

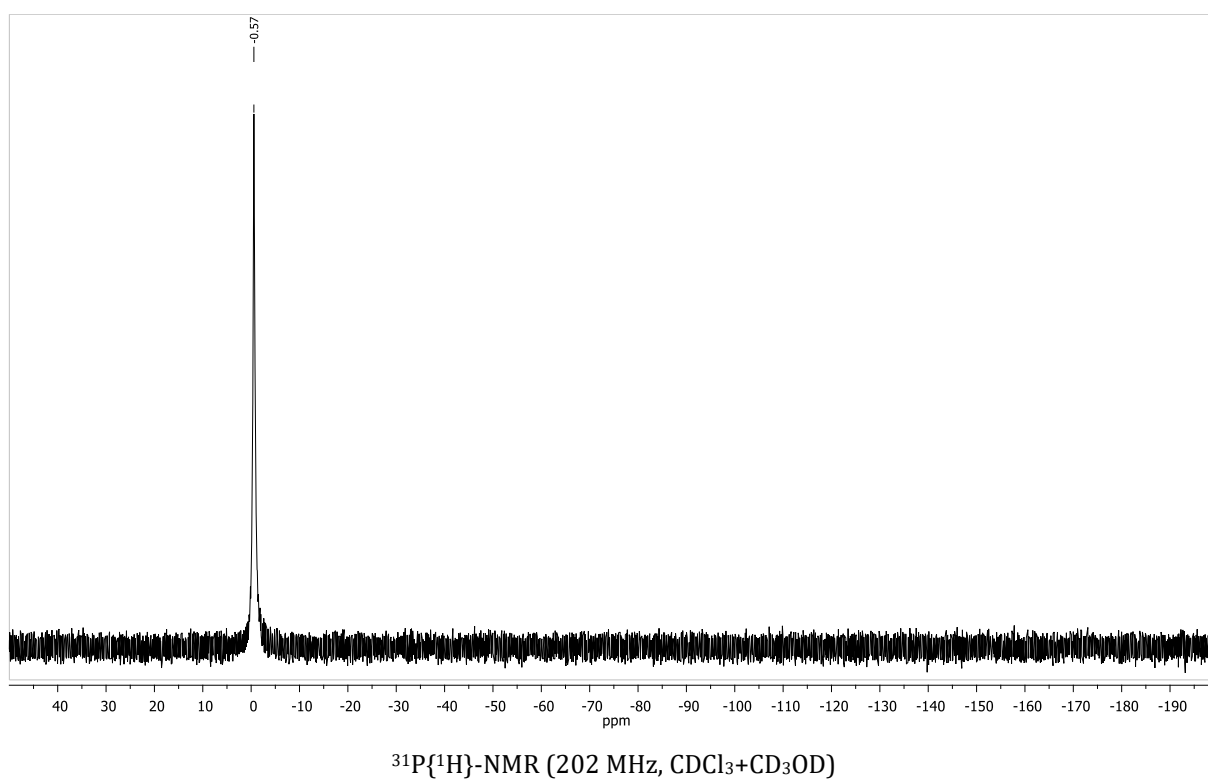
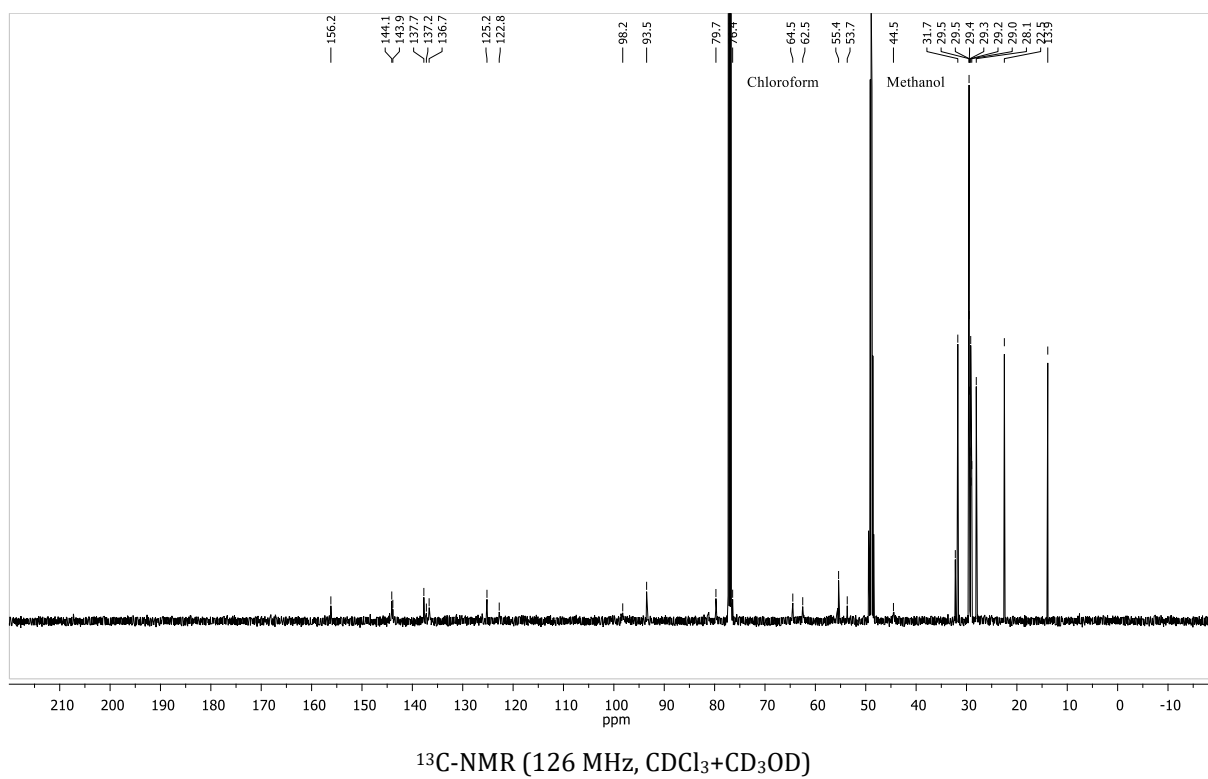


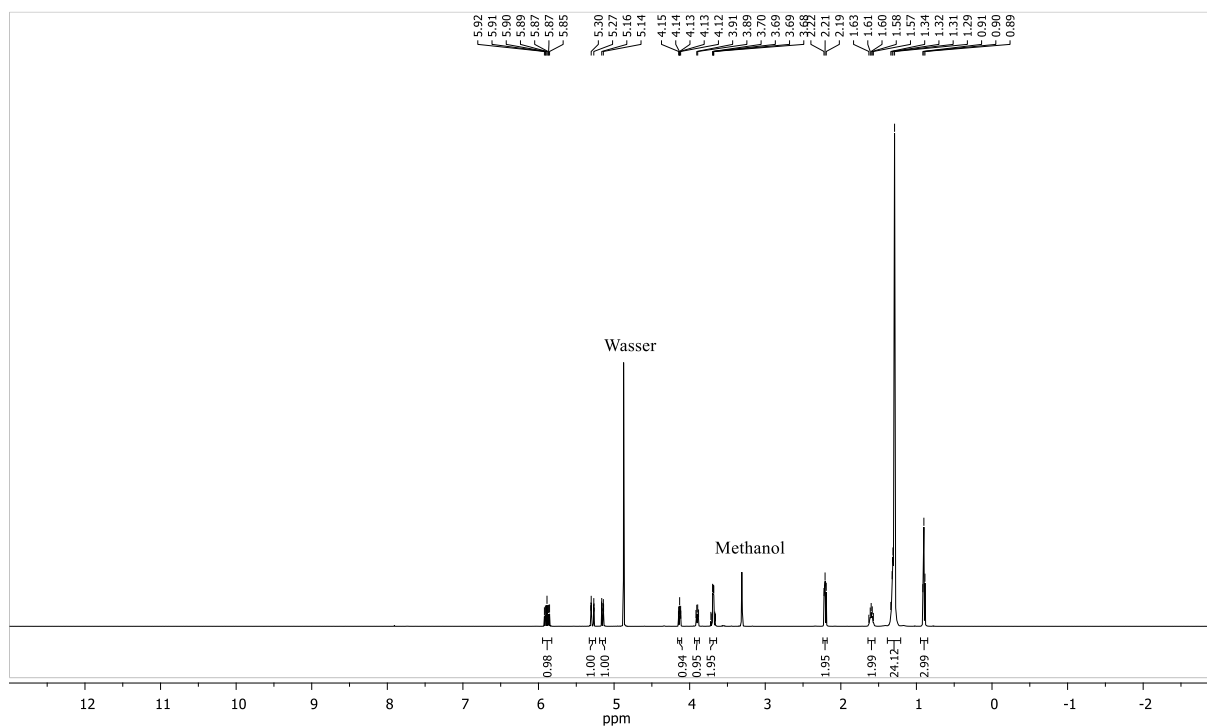
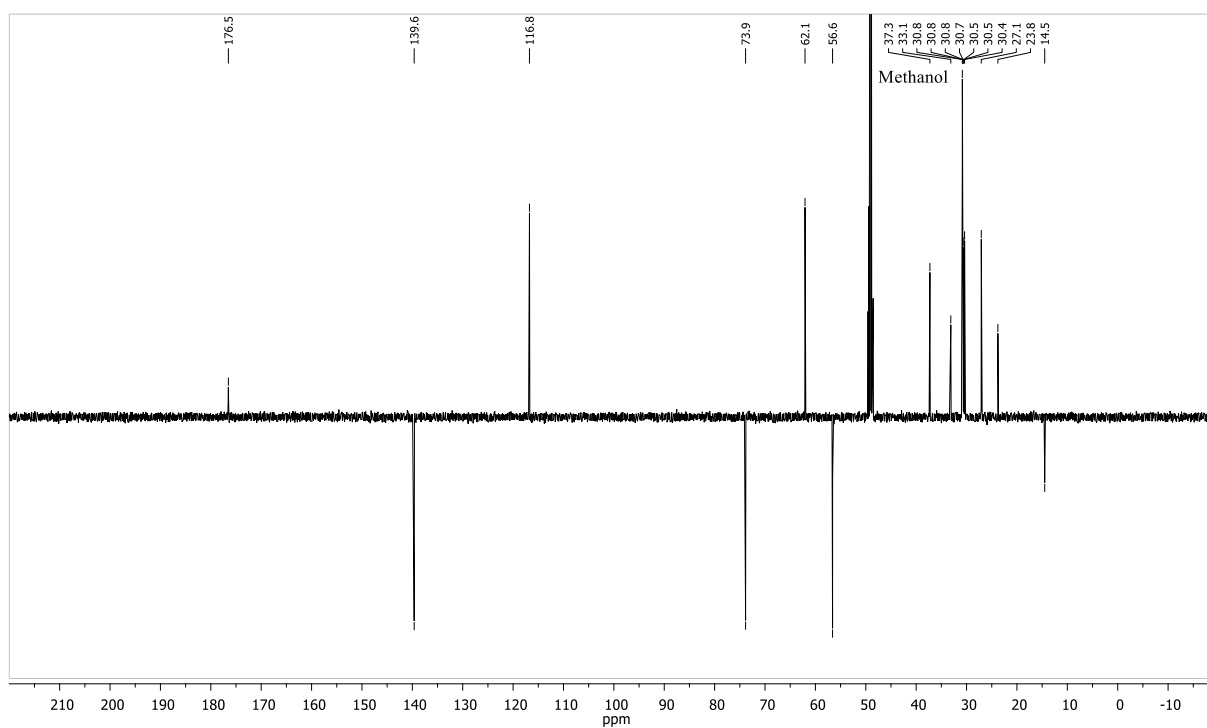
$^{13}\text{C-NMR}$  (126 MHz, Pyridin- $\text{d}_5$ )



**4-[(2*S*,3*R*,*E*)-2-(*tert*-Butyloxycarbonylamino)-3-(methoxymethoxy)octadec-4-en-1-phosphoethylamino]-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol 51**





***N*-((2*S*,3*R*)-1,3-dihydroxypent-4-en-2-yl)palmitamid 56**<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)<sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CD<sub>3</sub>OD)



## Publikationen, Konferenzteilnahmen & Auszeichnungen

### Publikationen

Einzelne Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

**Amplification of a FRET Probe by Lipid–Water Partition for the Detection of Acid Sphingomyelinase in Live Cells**

T. Pinkert, D. Furkert, T. Korte, A. Herrmann, C. Arenz,  
*Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, 56, 2790–2794.

**Eine durch Lipid-Wasser-Trennung verstärkte FRET-Sonde zur Detektion der Sauren Sphingomyelinase in lebenden Zellen**

T. Pinkert, D. Furkert, T. Korte, A. Herrmann, C. Arenz,  
*Angew. Chem.* **2017**, 129, 2834–2838.

**Differences and similarities in TRAIL- and TNF-mediated necroptotic signaling in cancer cells**

J. Sosna, S. Philipp, J. F. Chico, C. Saggau, J. Fritsch, A. Föll, J. Plenge, C. Arenz,  
T. Pinkert, H. Kalthoff, A. Trauzold, I. Schmitz, S. Schütze, D. Adam  
*Mol. Cell. Biol.* **2016**, 36, 2626–2644.

### Konferenzteilnahmen

**2015** VII. Nukleinsäurechemie-Treffen, Berlin, Deutschland

4. Berliner Chemie-Symposium, Berlin, Deutschland

**2013** 15. JCF-Frühjahrssymposium, Berlin, Deutschland

**2012** DFG SPP Meeting: Sphingolipids: Signaling and Disease, Essen, Deutschland

1<sup>st</sup> International Workshop on Molecular Medicine of Sphingolipids,  
Ramot, Israel

### Auszeichnungen

**2012** Promotionsstipendium des Fonds der Chemischen Industrie





## Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Thomas Pinkert, die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß §7 Abs. 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät, veröffentlicht im Amtlichen Mitteilungsblatt der Humboldt-Universität zu Berlin Nr. 21 / 2009 am 06. Juli 2009, angegebenen Hilfsmittel angefertigt zu haben.

---

Ort | Datum

---

Unterschrift

---



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die vielfältige Unterstützung bedanken, die ich während meiner Promotion erfahren habe.

Natürlich danke ich Prof. Dr. C. ARENZ für das anregende Thema, die große Freiheit in der Forschung, die Begleitung meiner Promotion und die Anfertigung des Gutachtens. Für die finanzielle und ideelle Förderung durch ein Stipendium möchte ich dem Fonds der Chemischen Industrie meine Anerkennung aussprechen.

Meiner Arbeitsgruppe, allen voran meinen geschätzten Mitdoktoranden und Laborgenossen CHRISTIAN KIMMICH, SUSANNE PLÖTZ, CHRISTIANE SCHÖNIGER, ALEXANDRA KLOSE-STIER, ROBERT HARMEL, ZAINELABDEEN AHMED, CLAUDINE DOJAHN und SUSANNE FICHT-REDMER sowie meinen Kollegen LAURA MARONGIU, STEPHANIE DIEDERICH und RICHARD WERBAN möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft, fachlichen Austausch, gesellige Racletteabende und reichlich Kuchen Danke sagen. Auch unseren Azubis, speziell MAREIN LÖWE und STEFAN REINHARDT, und meinen Studenten CHRISTIAN „HELMI“ KIMMICH und DAVID „TIPPITOPPI“ FURKERT möchte ich für die praktische Unterstützung im Labor danken.

Den technischen und administrativen Serviceabteilungen des Instituts für Chemie danke ich für die Bereitstellung der Arbeitsmittel und die Anfertigung von Analysen. Besonders ANGELA THIESIES, KATHARINA PFAFF und ANGELIKA WOYDA haben freundlicherweise unzählige Sonderwünsche „vor Licht geschützt“, „im Negativmodus“ und „schnellstmöglich“ erfüllt.

Mein Dank gilt ferner Prof. Dr. R. MAHRWALD für sein Gutachten, seinen Rat und Witz. Ihm, Prof. Dr. O. SEITZ und Prof. Dr. C. LIMBERG und ihren Arbeitsgruppen bin ich dankbar für die Nutzung ihrer Geräte und den freundschaftlichen Austausch von Edukten und Expertise. Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. A. HERRMANN und seinen Mitarbeitern für die herzliche Gastfreundschaft während meiner Messungen am Institut für Biologie.

DENISE PINKERT, ROY HERRMANN und CHRISTINA KUZNIA danke ich für das aufmerksame Lektorat meiner Arbeit in sportlich kurzer Zeit. Ich danke allen meinen Freunden am Institut für Chemie für diesen ganz besonderen Geist von Idealismus und Gemeinschaft, den ich hier erfahren durfte.

Besondere Wertschätzung möchte ich meiner Familie aussprechen, die mir stets ein Rückhalt war. Größte Anerkennung gilt meiner wunderbaren Frau DENISE, die mit mir das Projekt „2 Promotionen + 1 Kind“ furchtlos in Angriff nahm und eisern durchgezogen hat. Wir sind gemeinsam durch Höhen und Tiefen gegangen und sind daran gewachsen. · · ·